



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y
BIOLOGÍA CELULAR.

**“La ruta de señalización Notch en
hematopoyesis: comparación de la función de
Notch1 en células madre fetales y adultas.”**

TESIS DOCTORAL.

Isabel María Prados Siles, 2013.



La Dra. María José Sánchez Sanz, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.), Investigador Principal y jefe del grupo de investigación Hematopoyesis y Células Madre en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD) de la Universidad Pablo de Olavide en Sevilla, como directora de la Tesis Doctoral; y el Dr. José Antonio Sánchez Alcázar, Profesor titular del Área de Biología Celular de la Universidad Pablo de Olavide, como tutor de la Tesis Doctoral.

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por la licenciada Isabel M^a Prados Siles titulado “La ruta de señalización Notch en hematopoyesis: función de Notch1 en células progenitoras fetales y adultas”, ha sido realizado por ella bajo su dirección y supervisión en el CABD, y reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y calidad científica necesarias para constituir una Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Y para que así conste, expiden el presente certificado.

Directora:

Tutor:

María José Sánchez Sanz

José Antonio Sánchez Alcázar

AGRADECIMIENTOS.

Me gustaría aprovechar estas líneas para dar las gracias a todos aquellos que de una u otra manera han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a la Doctora María José Sánchez Sanz, directora de esta tesis, y al Prof. D. Jose Antonio Sánchez-Alcazar por su estímulo, orientación y apoyo, que han permitido llevar a buen término este trabajo.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), por la concesión de una beca JAE predoc para la realización de este proyecto. Al programa Consolider Ingenio 2010 del Ministerio de Ciencia e Innovación y al proyecto SAF 2007 64679, por la financiación de este trabajo.

Al Centro Andaluz de Biología del Desarrollo y su personal, por las facilidades ofrecidas para la elaboración de este trabajo.

Agradecer a todos los miembros del laboratorio 214, Ana, Valentine, y Ana María, también a Cristina por darme el relevo de su proyecto. También al personal del animalario, Ana, Candy, Mario, Bea y Antonio, de los cuales dependemos en todo momento y cuya labor ha sido esencial para la realización de este trabajo. Y a Kathy y Corin por su inestimable labor y ayuda con la citometría de flujo.

Financiación del Grupo.

La investigación en el grupo de M^a José Sánchez Sanz está parcialmente financiada por el MICINN (BFU2010-15801), por la Junta de Andalucía (REF. PAI Bio295 y SGUIT/08012007) y CONSOLIDER CSD-2007-00008. Toda la financiación española está cofinanciada por el programa de la unión europea FEDER.

ABREVIATURAS.....	19
INTRODUCCIÓN.....	25
PREFACIO.....	27
INTRODUCCIÓN.....	29
1. EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO EN RATÓN.....	29
1.1. Introducción a la Hematopoyesis.....	29
1.2 Identificación y Análisis in vivo de las Células Madre Hematopoyéticas de Médula Ósea.....	31
1.2.1 Ensayos funcionales para progenitores y células madre.....	31
1.2.2 Tipos de células madre hematopoyéticas en la médula ósea.....	33
1.2.3 Caracterización fenotípica de las CMHs.....	34
1.3 Nicho de las Células Madre Hematopoyéticas.....	37
1.3.1. Generalidades sobre la regulación molecular de la interacción de las Células Madre Hematopoyéticas con el nicho.....	39
1.4. Hematopoyesis Durante el Desarrollo Embrionario de Ratón.....	40
1.4.1. Hematopoyesis primitiva:.....	42
1.4.2. Hematopoiesis definitiva.....	43
1.4.2.a. PsP/AGM , vasos umbilicales y placenta.....	43
1.4.2.b. Hígado fetal.....	44
1.5. Diferencias entre CMHs Fetales y Adultas.....	45
1.5.1. Diferencias en la expresión de marcadores.....	46
1.5.2 Capacidad de diferenciación.....	46
1.5.3. Diferencias funcionales.....	46
1.5.4. Factores de transcripción y otras moléculas que afectan de forma diferencial a las CMHs fetales y adultas.....	48
2. LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH.....	50
2.1. Introducción.....	50
2.2. Los Receptores.....	50
2.3. El Dominio Intracitoplasmático de Notch.....	52
2.4. Los Ligandos de Notch.....	52

2.5. Regulación de la Ruta de Señalización Notch.....	53
2.5.1. Modificaciones postranscripcionales de Notch.....	54
2.5.2. Unión ligando receptor.	56
2.5.3. Interacción NIC/RBP en el núcleo celular.	57
2.5.4. Degradación de NIC.	58
2.5.5. Transcripción de genes diana de Notch.	59
2.6. Funciones de Notch.	60
2.6.1. Inducción lateral.....	60
2.6.2. Inhibición Lateral.	61
3. NOTCH1 Y LA HEMATOPOYESIS.	62
3.1. Introducción.	62
3.2. Notch en las Células Madre Hematopoyéticas Adultas.....	62
3.2.1. Activación de Notch en células madre hematopoyéticas.....	63
3.2.2. Efecto de la falta de función de Notch1.	63
3.2.3. Notch en el nicho de la médula ósea.	64
3.3. Notch Durante la Embriogénesis.	65
3.3.1. Notch1 en la hematopoyesis definitiva.	65
3.4. Notch en los Linajes Hematopoyéticos.	65
3.4.1. Función de Notch en la determinación de linaje linfóide T y B.	65
3.4.2. Relación de Notch con el linaje mieloide.	67
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....	69
MATERIALES Y MÉTODOS.	73
LÍNEAS DE RATONES TRANSGÉNICOS EMPLEADAS.....	75
1.1 Ratones Transgénicos para la construcción SV40/PLAP/+19 (SCL-3'Enh PLAP). Línea 1791.....	75
1.2. Ratones Transgénicos para las Construcciones SCL3'Enh-NIC1 y SCL3'Enh-lacZ. Líneas 197 y 318:	76
1.3. Línea Notch1 lox (Notch1 tm ² Rko/GridJ):	78
1.4. Línea R26R-EYFP:.....	78
1.5. Línea SCL-Cre-ER ^T :.....	79

1.6. Línea Act-DsRed (CAG-DsRed*MST-1Nagy/J):.....	79
1.7. Línea Silvestre:	79
2. TIPAJE DE RATONES TRANSGÉNICOS MEDIANTE PCR DE DNA GENÓMICO.	80
2.1. Extracción de gDNA a Partir de Muestras de Sangre.	80
2.2. Extracción de gDNA a Partir de Tejidos y Suspensión Celular.....	81
2.3. Tipaje de Animales Transgénicos mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	81
Tabla 1. Programa de PCR empleado.....	81
Tabla 2. Reactivos empleados en la reacción de PCR. Ejemplo de concentraciones para tipaje.....	82
3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRÁNSCRIPTOS.	84
3.1. Aislamiento de RNA.	84
3.2. Obtención de cDNA.....	84
3.3 Cuantificación Semicuantitativa de Tránscripotos.....	85
4. OBTENCIÓN Y TINCION DE EMBRIONES.....	86
Para la obtención de embriones a diferentes estadios de gestación, se establecen cruces y se revisa diariamente la aparición del tapón vaginal, designado como día cero de gestación (E0).....	86
4.4. Tinción de LacZ para Embriones:	86
4.5. Tinción de Fosfatasa Alcalina para Embriones:.....	86
5. OBTENCIÓN DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS.....	87
5.1. Obtención de Células Hematopoyéticas de Recién Nacido y de Adulto.	87
5.2. Obtención de Células Hematopoyéticas de Embriones.	88
6. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.	88
6.1. Análisis de Expresión de Marcadores de Superficie y Separación Celular mediante Citometría de Flujo.	88
6.2. Análisis de la Expresión de NIC-FLAG Intracitoplásmico Mediante FACS.	89
7. FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS MADRE: ENSAYOS DE REPOBLACIÓN A LARGO PLAZO.	90

7.1. Descripción del Modelo de Trasplante en Recién Nacidos.	90
7.2. Ensayos de Repoblación.....	91
7.2.1. Trasplante de poblaciones no fraccionadas.....	91
7.2.2. Trasplantes en dilución límite.....	91
7.2.3. Cotrasplantes de poblaciones lin-c-kit+.	92
7.2.4. Trasplantes secundarios.	92
7.3. .Análisis de quimeras hematopoyéticas.....	92
7.3.1 PCR semicuantitativa.....	93
El DNA genómico se extrae a partir de 1-5 x10 ⁶ células procedentes de diferentes órganos (sangre, bazo, médula y timo).....	93
8. ENSAYOS DE ANIDAMIENTO EN MÉDULA ÓSEA.....	93
9. ANÁLISIS DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE GENES DEPENDIENTES DE NOTCH POR PCR A TIEMPO REAL.	94
9.1. Diseño de los Oligonucleótidos Empleados y Test de Especificidad en Muestras de Timo.....	94
9.2. Aislamiento de RNA a Partir de Células Sorteadas.	97
9.3. Síntesis de cDNA.....	97
9.4. Cuantificación Relativa.	97
10. DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS RATONES NOTCH1 LOXP.....	98
10.1. Preparación del Tamoxifeno.....	98
10.2. Tratamiento y Determinación de la Dosis de Tamoxifeno.	98
10.3. Análisis de Células de Hígado Fetal Derivadas de Mutantes Condicionales para Notch1.....	98
11. PROTOCOLOS DE CULTIVOS.....	99
11.1. Ensayo CFU-C Células de Hígado Fetal.....	99
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	99
ANEXO.....	101
RESULTADOS.....	105
CAPITULO 1. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE NOTCH1 EN CÉLULAS MADRE Y PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DURANTE EL DESARROLLO.	107

1. ANÁLISIS DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS SCL-NIC.....	107
1.1. Análisis de la Expresión de NIC bajo el Control del Vector SCL-3'Enh en Médula Ósea.....	107
1.2. Determinación del Efecto de la Expresión de NIC en los Genes Regulados por Notch: GATA2, Notch1 y Hes1.....	111
1.3. Análisis Fenotípico de los Ratones Transgénicos SCL-NIC.....	114
1.3.1. Análisis fenotípico de la médula ósea.....	115
1.3.2. Análisis fenotípico del bazo y el timo en transgénicos SCL-NIC.....	117
2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA DE ADULTO DERIVADAS DE TRANSGÉNICOS SCL-NIC.....	119
2.1. Estimación de la Frecuencia de Células Madre Trasplantables en Médula Ósea Adulta de Transgénicos SCL-NIC.....	121
2.2. Cotrasplantes de Progenitores lin-c-Kit+ Procedentes de Médula Ósea.	124
2.3. Cinética de Reconstitución Hematopoyética a Corto Plazo.	126
2.4. Análisis de Retrotrasplantes. Rescate de la Capacidad de Repoblación de las Células SCL-NIC en Trasplantes en Receptores SCL-NIC.....	131
3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS MADRE DE HÍGADO FETAL DE TRANSGÉNICOS SCL-NIC.....	133
3.1. Análisis Fenotípico del Hígado Fetal de Embriones Transgénicos SCL-NIC.	133
3.2. Estimación de la Frecuencia de Células Madre Trasplantables en el Hígado Fetal de Transgénicos SCL-NIC.....	135
3.3. Cotrasplantes de Progenitores lin- c-Kit+ de Hígado Fetal E12.....	138
3.4. Contribución Hematopoyética en las Quimeras de Hígado Fetal a Corto Plazo.	139
3.5. Análisis de la Variación en los Niveles de Expresión de GATA2, Notch1 y Hes1 en Células Fetales SCL-NIC.....	143
3.6. Trasplantes Secundarios de Células de Médula Ósea Derivadas de Quimeras de Hígado Fetal.	144
4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA DE NEONATOS EN TRANSGÉNICOS SCL-NIC.....	148
4.1. Cotrasplantes de Progenitores lin-c-kit+ de Médula Ósea de Neonatos.....	148

4.2. Análisis de la Variación en los Niveles de Expresión de GATA2, Notch1 y Hes1 en Células de Médula Ósea de Recién Nacido.	150
4.3. Análisis de los niveles de expresión de SCL-NIC en Progenitores lin- c-kit+ de Médula Ósea de Adulto, Neonatal y de Hígado Fetal.	150
CAPITULO 2. EFECTO DE LA FALTA DE FUNCIÓN DE NOTCH1 EN CÉLULAS FETALES.....	152
1. GENERACIÓN DEL KNOCK-OUT CONDICIONAL DE NOTCH1 EN PROGENITORES Y CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS FETALES MEDIANTE EL SISTEMA DE RECOMBINACIÓN CRE-LOXP INDUCIDO POR TAMOXIFENO.	152
1.2. El Sistema de Recombinación CreLoxP.	152
1.3. Funcionalidad de los Ratones SCL-Cre-ER ^T . Pautas de Administración del Tamoxifeno y Eficiencia de Recombinación.....	153
2. ANÁLISIS DE RATONES SCL-CRE-ER ^T , R26R-EYFP;NOTCH1 ^{ff}	156
2.1. Obtención de Ratones SCL-Cre-ER ^T ;R26R-EYFP ^{ff/+} ;Notch1 ^{+/+} , y SCL-Cre-ER ^T R26R-EYFP ^{ff/+} ;Notch1 ^{ff} y Estrategia de Genotipado.	156
2.2. Eficiencia de Recombinación del Locus Notch1 ^{ff} tras la Inyección de Tamoxifeno.....	158
2.3. Expresión de los Genes Diana de Notch en Progenitores c-kit+ de Hígado Fetal E14 con Delección Condicional de Notch1.	159
2.4. Análisis Fenotípico del Hígado Fetal E14 de los Mutantes Condicionales de Notch1.....	161
2.5. Ensayo de Colonias CFU-C en el Hígado Fetal E14 de Mutantes Condicionales para Notch1.....	163
3. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS MUTANTES CONDICIONALES PARA NOTCH1 EN TRASPLANTES.....	165
3.1. Análisis de la Capacidad de Repoblación a Corto Plazo.	165
3.2. Análisis de la Capacidad de Repoblación a Largo Plazo.....	167
RESUMEN DE RESULTADOS.	175
DISCUSIÓN.....	177
1. LA CONSTRUCCIÓN TRANSGÉNICA SCL NIC 3'ENH.....	180
2 ACTIVACIÓN DE NOTCH1 EN LAS CMHS DE ADULTO. ¿CONTROL DE LA QUIESCENCIA Y AUTORENOVACIÓN?	181

3- INFLUENCIA DEL NICHOS EN RATONES SCL-NIC.	184
4-CASCADA DE ACCIÓN DE NOTCH ACTIVADO.	186
5-LAS CÉLULAS FETALES SON REFRACTARIAS A LA ACTIVACIÓN MEDIADA POR SCL-NIC: QUIESCENCIA, AUTO RENOVACIÓN Y EPIGENÉTICA.	187
6. EFECTO DE LA DELECCIÓN DE NOTCH1 SOBRE LAS CMHS DEL HÍGADO FETAL.....	191
CONCLUSIONES.....	197
BIBLIOGRAFIA.....	201
APENDICE.	217

LISTA DE FIGURAS.

FIGURA1. Diferenciación de las distintas células sanguíneas a partir de las células madre hematopoyéticas.	30
FIGURA 2. El vector de expresión SCL-3'Enh	36
FIGURA 3. Esquema de la composición del nicho de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea.	39
FIGURA 4. Desarrollo del sistema hematopoyético embrionario de ratón.	41
FIGURA 5. Transición de CMHs fetales a CMHs adultas.	48
FIGURA 6. Representación esquemática del receptor Notch en <i>Drosophila</i> y los cuatro receptores Notch en mamíferos.	51
FIGURA 7. Esquema representando los ligandos de Notch en mamíferos.	53
FIGURA 8. La ruta de señalización Notch	58
FIGURA 9. Ruta de degradación de Notch.	59
FIGURA 10. Inducción lateral.	61
FIGURA 11. Representación del locus SCL.....	76
FIGURA 12. Esquema representativo del gen Notch1.....	77
FIGURA 13. Representación de SCL-NIC.....	77
FIGURA 14. Locus Notch1.....	78
FIGURA 15. Esquema de generación de quimeras a partir de recién nacidos.	91
FIGURA 16. PCR a tiempo real para cuantificación relativa de genes diana de Notch en muestras control de timo fetal E14.	96
FIGURA 17. Determinación de la expresión de transcritos para NIC mediante RT-PCR.....	109
FIGURA 18. Análisis por citometría de flujo de la expresión de SCL-NIC mediante tinción con anticuerpo Flag en médula ósea.	110
FIGURA 19. RT-PCR semicuantitativa para Notch1 Hes1 y GATA2 en células de médula ósea total.....	112
FIGURA 20. PCR a tiempo real para cuantificación relativa de genes diana de Notch en células progenitoras lin-c-kit+ de médula ósea..	113
FIGURA 21. Frecuencia de progenitores hematopoyéticos en médula ósea.....	115
FIGURA 22. Análisis de las poblaciones celulares en médula ósea mediante citometría de flujo.....	116

FIGURA 23. Análisis de poblaciones celulares en bazo y timo de animales transgénicos SCL-NIC adultos. t.	118
FIGURA 24. Análisis de injerto a largo plazo en sangre periférica en animales trasplantados con células de médula ósea adulta..	120
FIGURA 25. Análisis de la expresión de FLAG en médula ósea de quimeras transcurridos cinco meses desde el trasplante	121
FIGURA 26. Estimación de la frecuencia células madre en médula ósea de transgénicos SCL-NIC.	122
FIGURA 27 Repoblación multilinaje en trasplantes analizados a largo plazo con células de médula ósea de animales SCL-NIC;DsRed.	123
FIGURA 28. Ensayos de cotrasplante.....	125
FIGURA 29. Repoblación multilinaje en cotrasplantes analizados a largo plazo.....	126
FIGURA 30 Análisis de la cinética de repoblación a corto plazo de las quimeras de médula ósea.	127
FIGURA 31. Análisis de injerto en médula ósea a corto plazo.....	129
FIGURA 32. Análisis fenotípico del bazo y el timo de las quimeras generadas con médula ósea NIC ^{DsRed} y SV ^{DsRed}	130
FIGURA 33. Análisis de injerto a largo plazo en sangre periférica de los retrotrasplantes mediante PCR PLAP.	132
FIGURA 34: Análisis de las células de hígado fetal derivadas de transgénicos SCL-NIC.	134
FIGURA 35. Análisis de repoblación a largo plazo en sangre periférica de animales trasplantados con células de hígado fetal E12 transgénicos para SCL-NIC.....	136
FIGURA 36. Determinación de la frecuencia de CMHs trasplantables.....	137
FIGURA 37. Repoblación multilinaje en trasplantes de células de FL E12 SCL-NIC.	138
FIGURA 38. Cotrasplantes de progenitores lin- c-kit+ de Hígado Fetal E12.	139
FIGURA 39. Análisis del injerto en médula ósea a corto plazo en las quimeras generadas con hígado fetal NIC ^{DsRed} y SV ^{DsRed}	141
FIGURA 40. Análisis del injerto en bazo y timo a corto plazo en las quimeras generadas con hígado fetal NIC ^{DsRed} y SV ^{DsRed}	142
FIGURA 41. Cuantificación relativa de genes diana de Notch en células de hígado fetal por qPCR.....	144
FIGURA 42. Caracterización de receptores primarios, quimeras de hígado fetal.. ..	146
FIGURA 43. Repoblacion a largo plazo en trasplantes secundarios.	147

FIGURA 44. Análisis qPCR de células c-kit ⁺ DsRed ⁺ procedentes de médula ósea de quimeras hígado fetal silvestre y transgénico SCL-NIC para los genes diana de Notch.....	148
FIGURA 45. Repoblación de células lin ⁻ c-kit ⁺ de médula ósea de neonato en ensayos de cotrasplante.....	149
FIGURA 46. Determinación de la expresión de genes en médula ósea total de neonato y en las poblaciones sorteadas lin ⁻ c-kit ⁺ y lin ⁺ c-kit ⁻	150
FIGURA 47. PCR semicuantitativa en cDNA de células lin ⁻ c-kit ⁺ procedentes de médula ósea de adulto médula ósea de neonato e hígado fetal E12 de ratones transgénicos SCL-NIC.	151
FIGURA 48. Función del sistema Cre-LoxP.....	153
FIGURA 49. Funcionalidad de los Ratones SCL-Cre-ER ^T	154
FIGURA 50. Expresión de YFP tras el tratamiento con 2mg/día de tamoxifeno.....	155
FIGURA 51. Ratones SCL-Cre-ER ^T ;R26R-EYFP ^{ff} ;Notch1 ^{ff}	156
FIGURA 52. Tipaje de embriones procedentes de cruces de ratones SCL-Cre;N1 ^{ff/+} , tratados y no tratados con tamoxifeno.	157
FIGURA 53. Eficiencia de recombinación del locus Notch1 en células de hígado fetal E14.....	158
FIGURA 54. Análisis de niveles de expresión de genes diana de Notch en hígado fetal E14 mutantes condicionales para Notch1 inducidos con Tx.....	160
FIGURA 55. Análisis fenotípico de células de hígado fetal E14 mutante condicionales para Notch1.	162
FIGURA 56. Análisis de progenitores mieloides CFU-C y porcentaje de células c-kit ⁺ en el hígado fetal de los embriones SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch ^{ff} tras la inyección de tamoxifeno.....	164
FIGURA 57. Análisis mediante citometría de flujo en sangre periférica de los ratones trasplantados con células de hígado fetal silvestre (N1 ^{+/+}) y mutante condicional (N1 ^{-/-}) inyectados con tamoxifeno.	166
FIGURA 58. Repoblación a largo plazo: Análisis de médula ósea de las quimeras generadas con células de hígado fetal E14 control Notch ^{+/+} y mutantes condicionales Notch ^{-/-}	168
FIGURA 59. Repoblación a largo plazo: Análisis del bazo de las quimeras generadas con células de hígado fetal E14 control Notch ^{+/+} y mutantes condicionales Notch ^{-/-} ..	169
FIGURA 60. Repoblación a largo plazo: Análisis de sangre de las quimeras generadas con células de hígado fetal E14 control Notch ^{+/+} y mutantes condicionales Notch ^{-/-}	170

FIGURA 61. Repoblación a largo plazo: Análisis del timo de las quimeras generadas con células de hígado fetal E14 control Notch ^{+/+} y mutantes condicionales Notch ^{-/-} .	172
FIGURA 62. Eficiencia de recombinación del locus Notch1 ^{fl} en células sorteadas YFP+ y YFP- de médula ósea (MO), bazo (B) y timo (T), procedente de las quimeras inyectadas con células de hígado fetal E14 Notch ^{+/+} (sv) y Notch ^{-/-} (mut)	173
FIGURA 63. Análisis de la expresión de Notch1 en células sorteadas YFP+ y YFP- de médula ósea, bazo y timo de las quimeras a largo plazo mediante qPCR.....	174
FIGURA 64. Esquema del efecto de SCL-NIC sobre las células madre hematopoyéticas adultas y fetales.	188

ABREVIATURAS.

Listado de abreviaturas empleadas en el texto de la tesis:

AGM: región del embrión que corresponde a la Aorta, Gónadas y Mesonéfrs.

CD: Cluster de diferenciación.

CFU-C: Unidades Formadoras de Colonias en Cultivo (del inglés *colony forming units-culture*).

CFU-S: Unidades Formadoras de Colonias en bazo.

CMH: Célula madre hematopoyética.

CH: quimera.

Ct: ciclo treshold. Empleado en PCR a tiempo real para establecer el ciclo a partir del cual se considera que la emisión de fluorescencia es específica.

DPBS: solución salina tamponada con fosfato (del inglés Dulbecco's phosphate buffered saline).

DNA: ácido desoxirribonucleico (ADN).

gDNA: ADN genómico.

DsRed: proteína fluorescente roja.

Enh: secuencia reguladora o potenciador (del inglés *Enhancer*).

FACS: clasificador de células vivas por fluorescencia (del inglés *Florescence-activated cell sorter*).

FCS: suero fetal de ternera (del inglés *fetal calf serum*).

FITC: isotiocianato de fluoresceína (del inglés *Fluorescein Isothiocyanate*).

Het: heterocigoto

HF: hígado fetal.

Hom: homocigoto.

hPLAP: gen reportero que codifica la fosfatasa alcalina de la placenta humana (del inglés *human-Placental Alkaline Phosphatase*).

Lin: linaje.

MO: médula ósea.

MO-N: médula ósea de neonato.

MOT: médula ósea total.

NCS: **Notch Cytoplamic Sequence** denominación de los oligonucleótidos empleados para detectar la construcción transgénica SCL-NIC.

NIC: Notch intracelular (forma activa). En este trabajo se denomina así a la construcción transgénica que contienen las líneas de ratones transgénicos L197 y I318

PBS: solución salina tamponada con fosfato (del inglés *Phosphate Buffered Saline*).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PE: Ficoeritrina (del inglés *Phycoerythrin*).

P/E: Penicilina/Estreptomicina

PI: Ioduro de Propidio (del inglés *Propidium iodide*).

PK: Proteínasa Kinasa.

hPLAP: gen reportero human placentar alkaline phosphatase

Q PCR: PCR cuantitativa. El término se emplea en esta tesis para referirnos a la cuantificación mediante PCR a tiempo real.

RT PCR: PCR de retrotranscripción.

SCL: (del inglés *Stem Cell Leukemia*).

SDS: Dodecil Sulfato Sódico (del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*).

SLAM : Molécula de activación de señal de linfocitos.

SSC: tampón citrato sódico salino (del inglés *Sodium Chloride-Sodium Citrate*).

SV: silvestre.

SV40: promotor de vectores de expresión derivado del Simian virus 40.

TG: transgénico.

YFP: proteína amarillo fluorescente (del inglés yellow fluorescent protein).

INTRODUCCIÓN.

PREFACIO.

Un aspecto relevante en el estudio de las células madre, es entender cómo responden a diferentes señales que influyen en su generación, expansión y diferenciación. El efecto de un mismo modulador en las células madre, puede variar dependiendo de factores como el estadio ontogénico, localización en el nicho, o estrés celular. Como resultado de la señal biológica, se obtendrán diferentes efectos en la funcionalidad de la célula madre que influirán en su potencial de autorenovación, diferenciación o de injerto en trasplantes, aspectos fundamentales en medicina regenerativa.

En general, se considera a las células madre hematopoyéticas (CMHs), como una población homogénea, sin embargo, existen subpoblaciones de células madre. En este trabajo de tesis, se comparan las CMHs fetales y adultas. Un factor influyente en las características de la célula madre es el contexto celular en el que se encuentra, y las señales que influyen en la interacción con dicho medio. Una de estas moléculas es la ruta de señalización de Notch, importante en procesos de desarrollo en general. Aquí se propone analizar el papel de Notch1 en células madre fetales y adultas. Los resultados muestran que las células fetales, incluyendo las de hígado fetal y las de médula ósea de recién nacido, son refractarias a la activación de Notch, mientras que en las células madre adultas, induce la pérdida de su capacidad de repoblación a largo plazo. Por otro lado, la falta de función de Notch1, que no parece afectar a la capacidad de injerto y repoblación multilínea de las células madre fetales, similarmente a lo que está descrito para las células madre hematopoyética de adulto. Estos datos, resaltan la importancia que tiene determinar el estadio ontogénico de la célula madre para predecir su respuesta a moduladores que afectan su capacidad de injerto.

INTRODUCCIÓN.

1. EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO EN RATÓN.

1.1. Introducción a la Hematopoyesis.

La hematopoyesis es el proceso mediante el cual las células madre hematopoyéticas (CMHs) generan todos los linajes sanguíneos. La diferenciación de CMHs ocurre de forma gerárquica y secuencial, de modo que, en el adulto, originan progenitores mieloides y linfoides que darán lugar a las células maduras circulantes como son los eritrocitos, macrófagos o linfocitos (Figura 1). En los mamíferos, el sistema hematopoyético adulto está compuesto por diferentes órganos que incluyen el bazo, el timo, los nódulos linfáticos y la médula de los huesos. Estos órganos están conectados por vasos sanguíneos y linfoides. En ellos se generan y expanden progenitores (médula ósea y timo), y proliferan las células efectoras (bazo y nódulos linfáticos) que intervienen en la defensa inmune, la coagulación de la sangre o la distribución de oxígeno.

En 1970, Metcalf y Moore y Till y McCullough (Metcalf and Moore 1970; Till, Wilson et al. 1970) demostraron que las CMHs y los progenitores multipotentes se localizan en la médula ósea adulta, la cual constituye el nicho donde se mantienen, dividen y diferencian. Las CMHs tienen dos características fundamentales: pluripotencialidad, es decir, la propiedad de generar todas las células sanguíneas maduras, y capacidad de autorenovación, que les permite mantenerse como población de células madre. En base a estas propiedades, las CMHs pueden sostener la continua renovación celular del sistema sanguíneo, proceso que ocurre durante toda la vida del individuo.

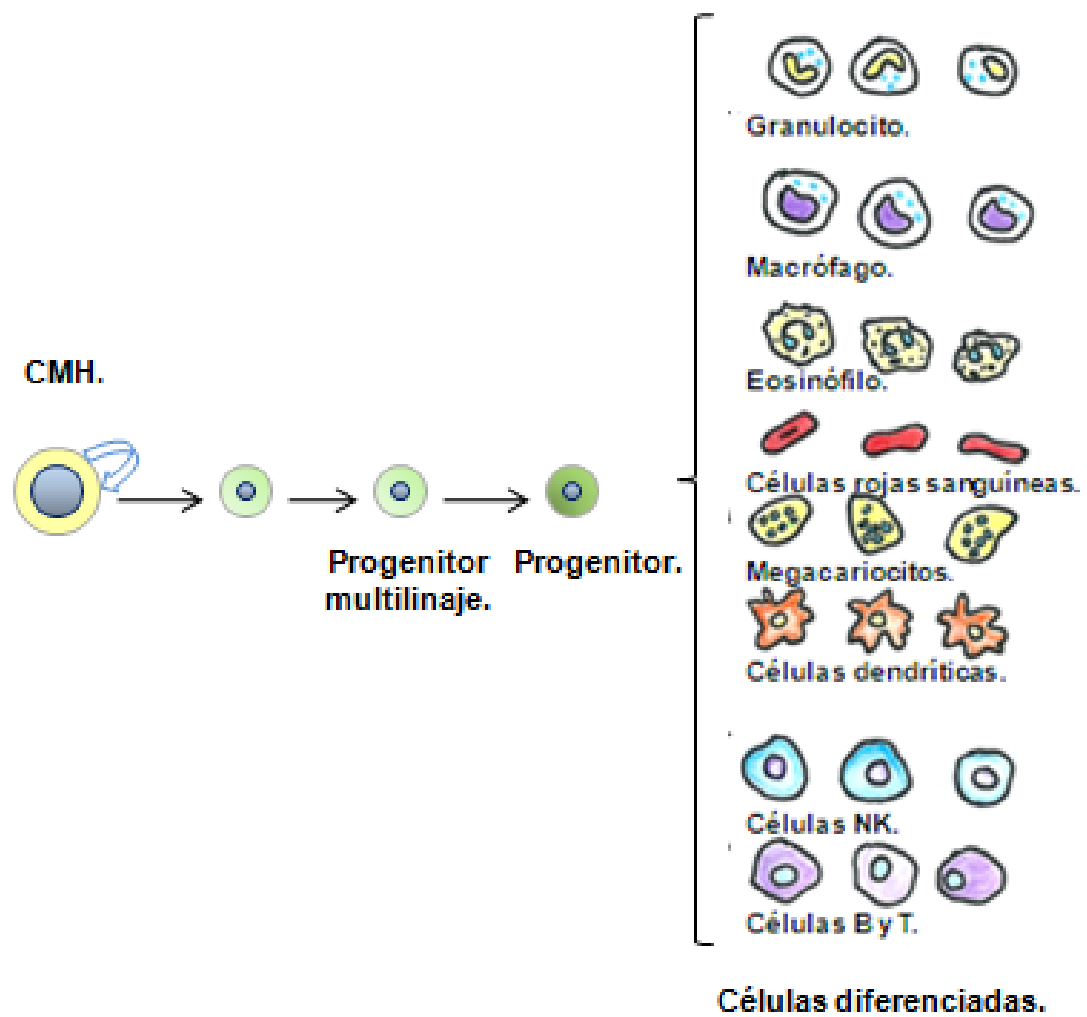


FIGURA1. Diferenciación de las distintas células sanguíneas a partir de las células madre hematopoyéticas.

1.2 Identificación y Análisis *in vivo* de las Células Madre Hematopoyéticas de Médula Ósea.

1.2.1 Ensayos funcionales para progenitores y células madre.

Existen varios ensayos funcionales que permiten determinar la presencia de progenitores hematopoyéticos, como los ensayos de formación de colonias *in vitro* CFU-C, e *in vivo* CFU-S, colonias formadas en el bazo de animales trasplantados. Sin embargo, para identificar de forma precisa las CMHs, es necesario emplear ensayos de trasplante y repoblación a largo plazo.

Los ensayos de formación de colonias son clonales, es decir, cada colonia deriva de un solo progenitor como demostraron los ensayos con marcajes retrovirales (Lemischka, Raulet et al. 1986). Estos ensayos permiten determinar la frecuencia de células progenitoras de diferentes linajes dependiendo de las condiciones de cultivo: colonias de linaje eritroide (BFU-E y CFU-E), megacariocítico (CFU-Mk), granulocítico (CFU-G), monocítico- macrófago (CFU-M) y de granulocitos/macrófagos (CFU-GM). Los CFU más inmaduros (multipotentes), contienen granulocitos, eritrocitos y, a menudo, megacariocitos (CFU-GEMM), y se suelen llamar CFC-mixto (Purton and Scadden 2007). Para determinar los CFU de células B y T, se emplean sistemas de co-cultivo con la línea celular OP9 derivada de médula ósea (Schmitt and Zuniga-Pflucker 2002). En general, aunque los ensayos de colonias *in vitro* ofrecen información sobre el contenido en progenitores en una población, no determinan el contenido en CMHs.

Las células progenitoras con capacidad CFU-S forman colonias en el bazo de ratones irradiados entre 1-3 semanas post-trasplante (Till and Mc 1961). Son células que injertan rápidamente, proporcionando radioprotección al ratón. Estos progenitores son pluripotenciales, más inmaduros que los CFUs pero más maduros que las CMHs, por lo que tampoco es un ensayo útil para determinar con precisión el contenido en CMHs.

A pesar de que estos ensayos a corto plazo, pueden proporcionar bastante información acerca de los progenitores de una población dada, el ensayo de referencia para medir CMHs es el ensayo de repoblación multilínea a largo plazo. Este ensayo permite

analizar un complejo proceso que comienza con la inyección de una población que contiene CMHs, seguido de su anidamiento en el nicho donde injerta, después proliferan para dar lugar a más CMHs, y se diferencian generando todas las células sanguíneas. La extensión de proliferación como célula madre se determina en trasplantes secundarios o seriados (!!! INVALID CITATION !!!). Para que las CMHs puedan injertar necesitan “espacio”. Este espacio debe ser creado en los individuos receptores mediante tratamientos citotóxicos que incluyen la irradiación o agentes químicos. El modelo clásico emplea receptores adultos letalmente irradiados (Cui, Hisha et al. 2002), donde injertan CMHs de tipo definitivo o adulto. Otros modelos más generales, donde injertan tanto las CHMs de embriones tempranos como las CMHs adultas, incluyen el trasplante en receptores recién nacidos tratados con busulfán (Yoder, Cumming et al. 1996), que se emplea en este trabajo. El busulfán es un agente mieloablativo que posibilita un alto nivel de injerto en los individuos trasplantados. El tratamiento citotóxico no sólo genera espacio en el nicho de injerto, sino que también elimina células potencialmente inmunoreactivas.

Cuando se realizan ensayos de trasplante, es importante que las células donantes y receptoras tengan un mismo fondo genético para evitar una reacción inmune severa contra las células donantes (Purton and Scadden 2007).

La cuantificación relativa del número de CMHs en una muestra, se consigue empleando el ensayo de repoblación competitivo y de repoblación competitivo en dilución límite de la muestra (Harrison 1980). Estos ensayos permiten medir el número de CMHs en una fuente desconocida, frente a un número de CMHs de una población conocida (normalmente médula ósea de ratones silvestres). Ambas poblaciones tienen que ir marcadas genéticamente. El número de unidades de repoblación (RU), en la población de células donantes desconocida puede ser determinado mediante una fórmula matemática:

$$RU \text{ donantes} = \% \text{ células donantes} \times C / (100 - \% \text{ células donantes}),$$

donde C = el número de RU competitivas y 1×10^5 células de médula ósea = 1 RU competitiva (Harrison, Jordan et al. 1993; Yuan, Astle et al. 2005).

El % de células donantes se suele determinar en la circulación, mediante cuantificación de los marcadores genéticos. En general se determina la contribución multilínea a los 4-6 meses post-trasplante, tiempo que garantiza la renovación, al menos, de células mieloides circulantes. Este ensayo, sin embargo, no es fiable si el número de CMHs es bajo (Harrison, Jordan et al. 1993), o si las CMHs donantes presentan problemas en el anidamiento o diferenciación. En general, para testar el efecto de modificaciones genéticas en la función de las CMHs, es preferible realizar ensayos de competición con células que llevan el vector de expresión sin el gen mutante. En los ensayos competitivos ambas poblaciones tienen que tener marcadores genéticos diferentes. Con frecuencia, se han empleado células de animales que llevan las isoformas CD45.1 y CD45.2 y transgénicos para vectores de expresión que llevan los genes reporteros LacZ, GFP, DsRed o PLAP, entre otros. Estos marcadores permiten detectar la células donantes directamente mediante citometría de flujo, o mediante PCR (Purton and Scadden 2007).

1.2.2 Tipos de células madre hematopoyéticas en la médula ósea.

Clásicamente, las CMHs de la médula ósea se han clasificado en base a su potencial de autorenovación en ensayos de trasplante, en CMHs de corto plazo y CMHs de largo plazo. Las CMHs de corto plazo, no son eficientes en la autorenovación y, por tanto, no pueden contribuir a la hematopoyesis a largo plazo, en cambio, pueden originar progenitores multilínea y conservan su capacidad de diferenciación a los distintos linajes hematopoyéticos (Morrison and Weissman 1994; Christensen and Weissman 2001; Pina and Enver 2007). Sin embargo, en los últimos años la posibilidad de realizar estudios de trasplante a nivel clonal ha permitido determinar la existencia de diversos tipos funcionales de células madre en la médula ósea. Basándose inicialmente en sus propiedades de diferenciación, las CMHs se han clasificado en: CMHs con capacidad deficiente para generar linfocitos (CMH \square), con capacidad deficiente para generar células mieloides (CMH \square y \square), y con igual potencial mieloide y linfóide (balanceadas, CMH \square). En general, el subtipo CMH \square y \square , que genera en trasplantes más células linfoides, tiene menor capacidad de autorenovación y no perdura más de 4 meses post-trasplante. Estos programas de diferenciación están predefinidos, pues en trasplantes seriados se mantienen las mismas capacidades y se ha establecido que la médula ósea de adulto favorece a las

CMH \square versus CMH \square (Benz, Copley et al.). Esta diversidad también se ve apoyada en el análisis del transcriptoma de células individuales mediante ensayos por microfluídica. Esto sugiere que existe una maquinaria molecular que respalda la diversidad de CMHs (Copley, Beer et al.). La clasificación funcional de las CMHs no siempre tiene un fenotipo asociado establecido, como a continuación se muestra, y aún se desconoce en general el papel que las modificaciones moleculares ejercen en las diferentes subpoblaciones.

1.2.3 Caracterización fenotípica de las CMHs.

El desarrollo de las técnicas de aislamiento de células basado en la detección de marcadores de fluorescencia y separación por citometría de flujo (FACS), ha permitido caracterizar a las CMHs (Goldschneider, Gordon et al. 1978; Spangrude, Heimfeld et al. 1988). En 1988, el grupo de Weissman demostró que las CMHs de médula ósea de ratón capaces de repoblar el sistema hematopoyético, podían identificarse en base a la expresión de antígenos en superficie como Sca-1, baja expresión de Thy 1.1, y ausencia de expresión de marcadores de linaje linfóide (CD4, CD8, B220), mielóide (Mac-1, Gr1), y eritroide (Ter119) (Lin-) (Spangrude and Weissman 1988; Uchida and Weissman 1992). Posteriormente, mediante el empleo de anticuerpos específicos para el receptor del SCF (stem cell factor), c-kit, se consiguió purificar aún más la población con CMHs y se denominó LSK (Lin-Sca1+c-kit+) (Ikuta and Weissman 1992) (Okada, Nakauchi et al. 1992). Sin embargo, la expresión en CMHs tanto del marcador Thy1.1 como Sca-1 depende de la cepa de ratón empleada. Así, Thy1.1 se expresa en los ratones C57BL/Ka-Thy1.1, pero no en los ratones C57BL/6, que son los más empleados para estudios de trasplante y los que se utilizan en este trabajo de tesis (Spangrude and Brooks 1992).

Más recientemente, se han empleado como marcadores CD34 y Flt3 (CD135), para distinguir CMHs con capacidad de repoblación a largo plazo (LKS+CD34-Flt3-), de las de corto plazo (LKS+CD34+Flt3-), y progenitores multipotentes (LKS+CD34+Flt3+) (Yang, Bryder et al. 2005). Pero siguen existiendo limitaciones en el uso de estos marcadores pues varían en diferentes fases del ciclo celular de las CMHs, y también después del trasplante (Spangrude, Brooks et al. 1995; Walkley, McArthur et al. 2005). Además, la expresión de CD34 varía con el estado de desarrollo del ratón, ya que se expresa en las CMHs de ratones con menos de 8 semanas de edad (Matsuoka,

Ebihara et al. 2001). Actualmente, se pueden obtener CMHs altamente purificadas empleando marcadores de superficie de la familia SLAM. Así las CMHs se caracterizan como CD150+CD244-CD48-, diferenciándose de los progenitores hematopoyéticos multipotentes CD150-CD244+CD48-, y de los progenitores CD150-CD244+CD48+ (Kiel, Yilmaz et al. 2005). Es más, diferentes tipos de CMHs, como CHMa se han podido separar en base a los niveles de CD150 (Copley, Beer et al.). En este trabajo se emplea el criterio Lin-c-kit+ para obtener una población enriquecida en CMHs.

Durante los último años también se han desarrollado marcadores moleculares que permiten no sólo el aislamiento por FACS , sino también la manipulación genética de las CMHs. Marcadores de este tipo los proporcionan vectores de expresión que tienen secuencias reguladoras o enhancers activos en CMHs en transgénesis. Algunos ejemplos de estos marcadores empleados en nuestro grupo, derivan de elementos reguladores del gen Ly-6E.1, Ly6a (Miles, Sanchez et al. 1997) y del gen SCL (Stem Cell Leukaemia) (Sanchez, Bockamp et al. 2001). En este trabajo de tesis, se emplea el SCL-3'Enhancer.

El gen SCL, también conocido como TAL-1 (del inglés T cell Acute Leukemia-1), codifica un factor de transcripción hélice- lazo- hélice, expresado en células madre hematopoyéticas (CMHs), eritrocitos, megacariocitos, así como en angioblastos, células endoteliales maduras, y áreas específicas del sistema nervioso central (Begley and Green 1999). Las secuencias reguladoras del gen SCL constituyen, por tanto, potenciales elementos de expresión génica para generar vectores activos en progenitores hemangioblásticos, CMHs y endotelio en transgénesis. Entre las secuencias reguladoras, se ha caracterizado el enhancer 3' de 5,5 Kb que presenta actividad en CMHs, progenitores hematopoyéticos, megacariocitos, osteoblastos y endotelio vascular durante del desarrollo de ratón (Sanchez, Bockamp et al. 2001; Bloor, Sanchez et al. 2002). Por consiguiente, es importante resaltar, que el vector de expresión SCL-3'Enh, empleado en este trabajo, presenta un campo de expresión que incluye las CMHs y células de nicho, como son los osteoblastos, endotelio y megacariocitos (Figura 2).

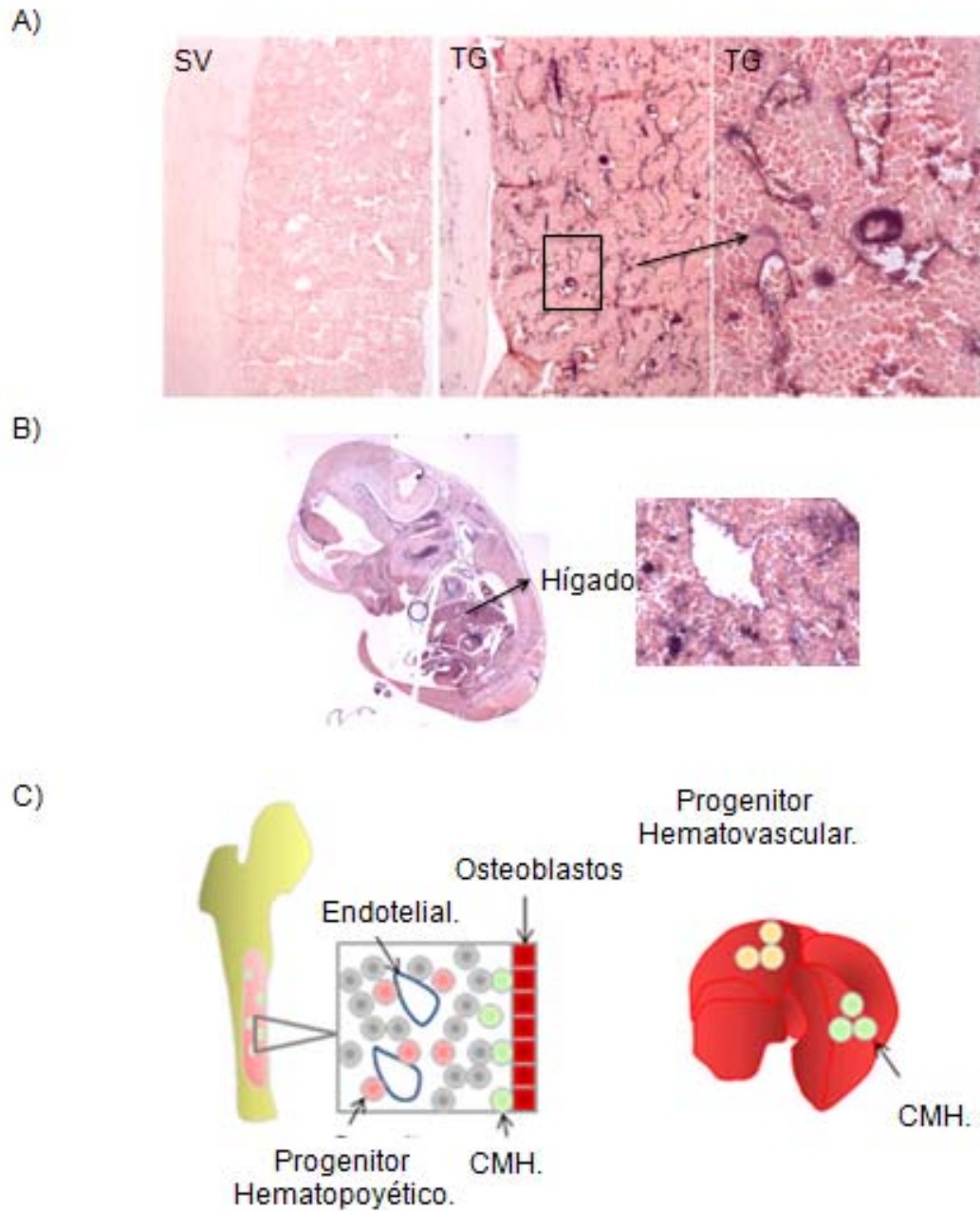


FIGURA 2. El vector de expresión SCL-3'Enh dirige la expresión a CMH, megacariocitos, osteoblastos, endotelio y progenitores en la médula ósea (en color marron). En el hígado fetal se expresa en CMH, megacariocitos y la red vascular sinusoidal. Transgénico SCL-3'Enh-hPLAP, (A) sección de medula ósea, (B) sección de hígado fetal (C) esquema de médula ósea e hígado fetal

1.3 Nicho de las Células Madre Hematopoyéticas.

El vínculo entre la formación de la médula ósea (lugar de la hematopoyesis en el adulto), y el desarrollo del hueso (osteogénesis), fue reconocido por primera vez en los años setenta cuando los estudios mostraron que, primero el hueso y, más tarde, la médula ósea, se desarrollan tras la inyección subcutánea de médula ósea total no manipulada (Patt and Maloney 1972; Patt and Maloney 1975). El término “nicho”, empleado para designar el microambiente específico de las CMHs de la médula ósea lo utilizó por primera vez Schofield, quien propuso que las células madre hematopoyéticas están en contacto íntimo con el hueso, y que el contacto célula-célula era el responsable de su aparentemente ilimitada capacidad proliferativa, y de que su proceso de maduración se encuentre inhibido (Schofield 1978).

La médula ósea de los principales huesos largos es el órgano hematopoyético más importante durante la vida adulta. Las células hematopoyéticas son retenidas dentro de la cavidad ósea hasta que alcanzan el grado de maduración apropiado y es entonces cuando son liberadas al torrente sanguíneo. Las CMHs y los progenitores están rodeados por diferentes células estromales, que incluyen condriocitos, células endoteliales, fibroblastos y osteoblastos, junto con una matriz extracelular que las propias células producen, y que se compone de fibronectina, laminina, colágeno y proteoglicanos. La interacción de ambos tipos de células, hematopoyéticas y estromales, junto con señales mediadas por factores de crecimiento solubles y unidos a membrana, son importantes en la regulación de la hematopoyesis de la médula ósea adulta. Todos estos elementos forman el nicho de las células madre, y ofrecen el microambiente necesario para que estas células se autorenueven o se diferencien. (Mendez-Ferrer, Michurina et al.). En resumen, las células del nicho incluyen:

- Células mesenquimales: células pluripotentes y adultas con morfología fibroblastoide y plasticidad hacia diversos linajes como condrocitos, osteocitos y adipocitos entre otros. Los podocitos asociados a la vasculatura de la médula ósea también forman parte del nicho, se caracterizan por expresar el marcador Nestin+ y también se denominan células mesenquimales estromales (MSC).

- Células del hueso: incluyen condrocitos, que se encuentran en el cartílago y producen colágeno y proteoglicanos, y osteoblastos, involucrados en el desarrollo, reparación y crecimiento de los huesos. Recientemente, se ha obtenido la evidencia morfológica que demuestra la presencia de las CMHs cerca del endostio. Así, se ha demostrado que las CMHs o los progenitores hematopoyéticos, se localizan cerca del revestimiento endóstico de las cavidades de la médula ósea en las regiones trabeculares de los huesos largos, mientras que los progenitores más diferenciados suelen encontrarse en el centro de la médula ósea (Nilsson, Johnston et al. 2001; Askenasy and Farkas 2003; Zhang, Niu et al. 2003; Wilson, Murphy et al. 2004). También se ha demostrado que el incremento en el número de osteoblastos se correlaciona directamente con un incremento en el número de CMHs funcionales a largo plazo, lo que indica que los osteoblastos (o algún subtipo de estas células), son parte esencial del nicho en la médula ósea (Nilsson, Johnston et al. 2001; Calvi, Adams et al. 2003; Zhang, Niu et al. 2003).

- Células endoteliales: constituyen el nicho vascular y está formado por el endotelio sinusoidal. Diferentes experimentos sugieren que las CMHs activadas y proliferativas se localizan asociadas al endotelio mientras que las no proliferativas o quiescentes se asocian a los osteoblastos (Moore 2012).

Las CMHs identificadas mediante ensayos a largo tiempo, se encuentran casi exclusivamente localizadas en el nicho del endostio (Zhang, Niu et al. 2003), por lo que es probable que este nicho contenga las CMHs latentes y que sirva como nicho de mantenimiento de células quiescentes y con capacidad de autorenovación. La delección de los osteoblastos puede dar lugar a hematopoyesis extramedular para compensar la falta de función hematopoyética de la médula ósea (Visnjic, Kalajzic et al. 2004), por tanto, el nicho vascular por si sólo no es suficiente para mantener la hematopoyesis a largo plazo. Esto indica que en la médula ósea, este nicho vascular debe tener un papel secundario, requiriendo el influjo de las CMHs del nicho endóstico.

Recientemente, se ha demostrado que moléculas de adhesión E-selectine, expresadas en el endotelio vascular de médula ósea, interviene en la interacción con las CMHs induciendo su proliferación (Winkler, Barbier et al.). La localización de las CMHs, cercanas a los sinusoides, podría permitirles monitorizar constantemente la

concentración de factores de transmisión hemática que reflejan el estado del sistema hematopoyético y, en situaciones de estrés hematopoyético, podrían responder de forma rápida y robusta y llamar a más CMHs del endostio de ser necesario (Wilson and Trumpp 2006).

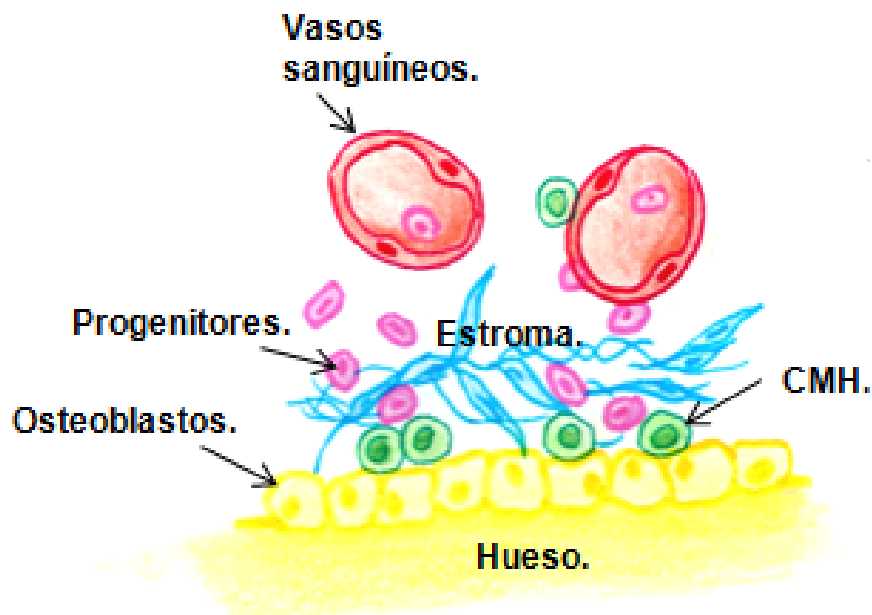


FIGURA 3. Esquema de la composición del nicho de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Se representan ambos componentes del nicho, endóstico y vascular.

1.3.1. Generalidades sobre la regulación molecular de la interacción de las Células Madre Hematopoyéticas con el nicho.

La interacción de las CMHs con el nicho, está regulada a diferentes niveles que incluyen movilización desde/hacia la médula, proliferación y diferenciación. Entre otras, se ha descrito que las moléculas que intervienen en la movilización incluyen factores solubles como el GM-CSF, que degrada señales de retención en el nicho mediadas entre otros por el SCF/c-Kit, moléculas de adhesión VCAM1 o quimiotrayentes como CXCL12/CXCR4 y bFGF (Wilson and Trumpp 2006). También intervienen receptores de señalización célula-célula que intervienen en la modulación del proceso de autorenovación y diferenciación mediados, entre otros, por regulación de la división

simétric/asimétrica de CMHs (Morrison and Kimble 2006). Entre ellos, se encuentran las rutas de Notch, Wnt, y Hedgehog (Blank, Karlsson et al. 2008). Así, los diferentes receptores de Notch y sus ligandos se expresan en las células de médula ósea y el cocultivo de CHMs con estroma que expresa ligandos de Notch induce su activación. Además, la activación de Notch *in vivo*, incrementa el número de CMHs {Stier, 2002 #110}. También se ha puesto de manifiesto que el incremento de ligando jagged1 en osteoblastos, inducido por tratamiento de los ratones con PTH (hormona paratiroidea), resulta en un incremento de CMHs (Calvi, Adams et al. 2003). Estos datos sugieren un papel activo de los receptores Notch en la homeostasis de las CMHs. De todas formas, la regulación mediada por estas rutas de señalización es compleja, y no siempre la activación tiene un efecto opuesto a la falta de función, que en el caso de la ruta de Notch no presenta ningún efecto en las células adultas (Maillard, Koch et al. 2008).

1.4. Hematopoyesis Durante el Desarrollo Embrionario de Ratón.

Las células sanguíneas son derivados mesodérmicos y se especifican alrededor del día 6 (E6) de desarrollo embrionario en ratón. El sistema hematopoyético embrionario difiere notablemente del adulto, variando tanto la composición de los tipos de células sanguíneas como su localización a lo largo del desarrollo. En general, se considera que las localizaciones donde emergen las células sanguíneas en el embrión temprano son, secuencialmente en el tiempo, el saco vitelino (a día 6-7 de desarrollo embrionario, E6-E7), la zona asociada a la aorta central, el AGM -aorta-gónada-mesonefros (E8-9), y el hígado fetal (E10). La pared de otros vasos como las arterias umbilicales y vitelinas, así como la placenta también presentan actividad hematopoyética (Medvinsky, Rybtsov et al.). Sigue existiendo un amplio debate acerca de cuáles son las zonas generadoras de sangre y las zonas receptoras de células circulantes, tema complicado por el hecho de que, a partir del día 8 de desarrollo, el corazón empieza a bombear y distribuir células a través de la circulación. Entre los días 12-16, el hígado fetal de ratón es el órgano hematopoyético más prominente, donde se produce la mayor expansión de CHMs durante el desarrollo. En el hígado también se detecta una masiva proliferación de eritrocitos y las primeras células megacariocíticas, precursores linfoides y mieloides (Serrano, Cortegano et al. ; de Andres, Gonzalo et al. 2002). Entre los días 12 y 13 de desarrollo se van estructurando

los órganos periféricos como el timo y el bazo. A partir del día 16, la médula ósea adquiere su función como lugar de generación y maduración de progenitores hematopoyéticos que perdurará durante toda la vida adulta (Figura 4).

En cada una de estas localizaciones embrionarias las características de las células hematopoyéticas son diferentes, tanto a nivel de células efectoras, como de progenitores o células madre hematopoyéticas. Clásicamente, se ha denominado HEMATOPOYESIS PRIMITIVA a la generación de células hematopoyética en estadios tempranos de desarrollo y HEMATOPOYESIS DEFINITIVA a la generación de células hematopoyéticas a partir de día 10-11 de desarrollo, coincidiendo con la aparición de células madre hematopoyéticas definitivas en el AGM. Las células derivadas de ambas actividades hematopoyéticas coinciden durante un tiempo. Así, los eritrocitos nucleados, derivados del saco vitelino se encuentran simultáneamente con los eritrocitos enucleados originados en el hígado fetal E11. La relación ontogénica entre progenitores hematopoyéticos primitivos y definitivos aún no está totalmente clara (Medvinsky, Rybtsov et al.).

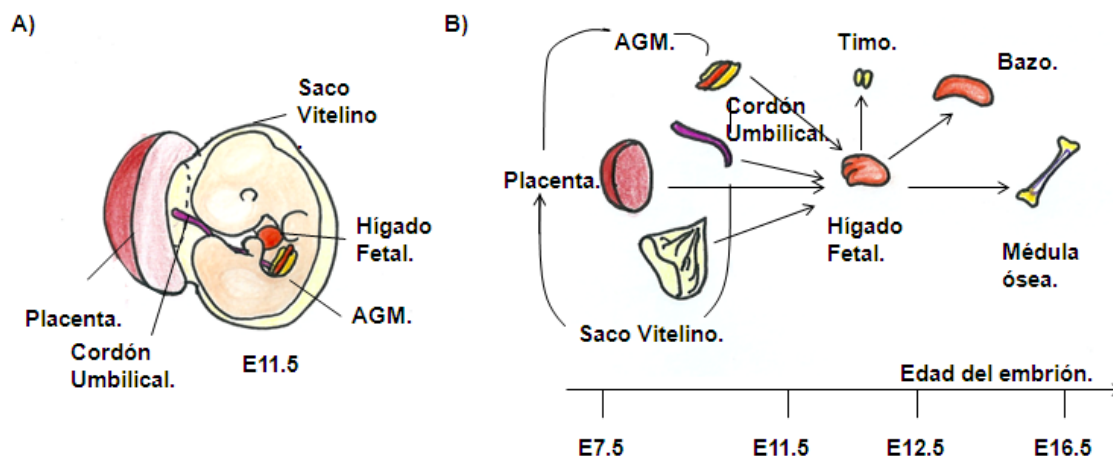


FIGURA 4. Desarrollo del sistema hematopoyético embrionario de ratón. **A)** Esquema de un embrión de ratón a día 11.5 mostrando las diferentes localizaciones hematopoyéticas. **B)** Modelo de desarrollo en varios sitios hematopoyéticos. Progenitores hematopoyéticos y CMHs definitivas de las localizaciones mostradas en A), se distribuyen a través de la circulación a partir de día 8 (como indica la flecha circular), y colonizan el hígado. Después de la expansión en el hígado, las CMHs definitivas colonizan la médula ósea, el bazo y el timo. (Adaptado de(Medvinsky, Rybtsov et al. 2011).

1.4.1. Hematopoyesis primitiva:

Surge en el saco vitelino del embrión de ratón a día 7 de desarrollo, (Moore and Metcalf 1970; Liu and Auerbach 1991; Cumano, Furlonger et al. 1993; Huang and Auerbach 1993). Una hipótesis que se ha mantenido durante mucho tiempo, propone un origen común de los linajes hematopoyéticos y endoteliales, el hemangioblasto (Sabin 1916). La formación del hemangioblasto está regulada, entre otros, por el gen SCL (Stem Cell Leukaemia), esencial para el desarrollo de todos los linajes hematopoyéticos, y cuya sobreexpresión produce exceso de producción de células sanguíneas y de células similares al hemangioblasto en el pez cebra (Gering, Rodaway et al. 1998).

Durante esta fase de la hematopoyesis aparecen células eritromieloides, eritrocitos nucleados y macrófagos. Sin embargo no se generan células madre hematopoyéticas definitivas (las CMH definitivas se definen como CMHs capaces de repoblar el sistema hematopoyético cuando son trasplantadas en el modelo clásico de ratones adultos letalmente irradiados). En general, se considera que las células generadas en la fase temprana del desarrollo tienen un potencial limitado y son sustituidas por células que surgen durante la hematopoyesis definitiva. Sin embargo, el reciente descubrimiento de la existencia de macrófagos dependientes de Myb generados en saco vitelino antes de la aparición de las CMHs definitivas y que perduran durante la vida adulta (Schulz, Gomez Perdiguero et al. 2012), sugieren que la hematopoyesis primitiva no es totalmente transitoria, corroborando datos previos de otros autores. (Samokhvalov, Samokhvalova et al. 2007). En el trabajo de Samokhvalov y colaboradores, emplean un sistema de marcaje y seguimiento celular consistente en la expresión de Cre inducible por inyección de tamoxifeno bajo la regulación de Runx que induce la recombinación en el locus Rosa26-Lox-STOP-Lox LacZ. El marcaje de células tempranas y su detección en el adulto por LacZ apoya la idea de que el origen de la jerarquía hematopoyética adulta está en el saco vitelino embrionario.

1.4.2. Hematopoiesis definitiva.

1.4.2.a. PsP/AGM , vasos umbilicales y placenta.

Las células madre hematopoyéticas definitivas aparecen en la región del AGM a partir del día 10.5 de desarrollo, (Muller, Medvinsky et al. 1994; Medvinsky and Dzierzak 1996). Sin embargo, en estadios más tempranos (E9.5) también se pueden encontrar progenitores hematopoyéticos multipotentes en la para-aorta esplecnopleura (PsP), estructura que da lugar al AGM (Godin, Dieterlen-Lievre et al. 1995; Godin, Garcia-Porrero et al. 1999). Estos progenitores de la PsP, pueden repoblar el sistema hematopoyético de animales inmunodeficientes para células natural killer (NK) y linfocitos (Rag2 mutantes) (Bertrand, Giroux et al. 2005), o en recién nacidos tratados con busulfan (Yoder, Cumming et al. 1996). Sin embargo, no injertan cuando son trasplantados en modelos convencionales de adulto irradiados. Se considera, por tanto, que contienen CMHs inmaduras. Recientemente, se ha demostrado que las CMHs inmaduras, pueden evolucionar a CMHs definitivas si se pre-cultivan con trombopoyetina (Kieusseian, Brunet de la Grange et al. 2012), demostrando así una conexión de linaje de CMHs primitivas y definitivas. Esta maduración se realiza en el AGM (Rybtsov, Sobiesiak et al. 2011), y en hígado fetal (Kieusseian, Brunet de la Grange et al. 2012).

Observaciones morfológicas muestran agrupaciones celulares en la zona ventral de la aorta, que se han identificado con CHMs (Dzierzak and Medvinsky 2008). Estas agrupaciones también se han observado en otros vasos incluyendo los vasos umbilicales (Liakhovitskaia, Gribi et al. 2009), y desaparecen junto con las agrupaciones del AGM en mutantes de Runx1, factor de transcripción esencial para la formación de CMH definitivas (Chen, Yokomizo et al. 2009). Esta asociación directa con las células endoteliales indica una relación ontogénica con el endotelio adyacente. Recientemente, se ha determinado que cierto tipo de células endoteliales originan células sanguíneas. Mediante el marcaje y seguimiento genético empleando el sistema Cre/lox inducido, se ha conseguido marcar de forma específica el endotelio y el mesénquima adyacente de forma separada durante el desarrollo del AGM. Para marcar el endotelio se ha empleado la línea de ratón VE-cadherin-Cre, determinándose que las CMHs emergen del endotelio del AGM. (Zovein, Hofmann et

al. 2008). El endotelio con capacidad hematopoyética se denomina endotelio hemogénico. Este endotelio se ha localizado en diversas zonas del embrión incluyendo el saco vitelino (Yoshimoto, Montecino-Rodriguez et al.). Así mismo, resultados empleando otros marcadores endoteliales parecen indicar la existencia de endotelio hemogénico generador de diferentes tipos celulares sanguíneos incluyendo células mieloides y CMHs derivadas de endotelio Ly6a+ (Chen, Li et al. 2011).

La placenta es otra zona donde se pueden encontrar CMHs definitivas (Dancis, Jansen et al. 1977). La porción coriónica de la placenta de ratón expresa Runx1 desde estadios tempranos del desarrollo y, cuando se aísla, antes de su unión al alantoides, puede dar lugar a células hematopoyéticas en cultivo (Zeigler, Sugiyama et al. 2006).

Mediante ensayos de trasplante, se ha demostrado que las CMHs definitivas aparecen en la placenta al mismo tiempo que en la zona del AGM, en torno al estadio E10,5-11 de desarrollo (Zovein, Turlo et al. ; Gekas, Dieterlen-Lievre et al. 2005; Ottersbach and Dzierzak 2005; Dzierzak and Speck 2008). De forma paralela al AGM, la placenta desarrolla rápidamente una importante reserva de CMHs definitivas, que va disminuyendo a partir de día E15,5 de desarrollo, relacionado con su salida al torrente sanguíneo y migración al hígado fetal.

1.4.2.b. Hígado fetal.

Mientras que el AGM constituye la zona por excelencia para abordar estudios sobre generación de CMHs a partir de progenitores de diferente naturaleza, el hígado ha sido el órgano de elección para el estudio de la biología y comportamiento de las células madre hematopoyéticas del embrión/feto. En los últimos años nuestro grupo junto con otros laboratorios, ha trabajado en la caracterización de precursores hematopoyéticos de hígado fetal y las redes de regulación transcripcional mediadas entre otros, por el gen SCL. El hígado es un órgano fundamentalmente hematopoyético entre los estadios E10-14, detectándose las primeras CMHs definitivas a partir del estadio E11.5. En general, se considera que el hígado fetal es receptor de CMHs, pero no tiene el potencial generador. Además, el hígado es el órgano donde se produce la mayor expansión de CMHs en todo el embrión (50 – 100 veces), aunque los factores que determinan este crecimiento aún no se conocen. La caracterización fenotípica de las CMHs de hígado fetal incluye el marcador c-Kit. La

población c-kit⁺ también abarca todos los progenitores mielodes que se diferencian de los eritroides por no expresar Ter119. Otros marcadores como CD41 y CD45 son detectados en ciertas subpoblaciones de pre-CMH.

El microambiente hematopoyético en el hígado fetal está formado por componentes celulares hepáticos, mesenquimales, hematopoyéticos y endoteliales (Chou and Lodish). Así mismo, se ha demostrado que las células hematopoyéticas EPCR⁺ (del inglés Endothelial Protein C Receptor), con capacidad de reconstitución hematopoyética a largo plazo, residen en el microambiente perisinusoidal del hígado fetal de día 12 de desarrollo, mediante secciones de hígado y tinción con anti-EPCR y anti-Lyve1 (marcador que se expresa en los sinusoides del hígado). En torno al 92% de las células EPCR⁺ se localizan junto a los sinusoides. Co-cultivos de poblaciones EPCR⁺ con endotelio sinusoidal inducen proliferación de progenitores. Algunas de estas células EPCR⁺ también coexpresan c-kit, lo que sugiere que los sinusoides del hígado fetal forman el nicho que mantiene a los progenitores en esta fase del desarrollo. (Iwasaki, Arai et al. 2010). La ruta de señalización de Notch se ha descrito en los componentes epiteliales (Zong, Panikkar et al. 2009), así como en los componentes endoteliales (Poulos, Guo et al.). Su función en la proliferación y diferenciación de CMHs fetales aún no está claro.

1.5. Diferencias entre CMHs Fetales y Adultas.

Las CMHs del hígado fetal poseen características propias y distinguibles de los progenitores adultos. Así, difieren en el potencial de diferenciación (Ikuta, Kina et al. 1990; Hardy and Hayakawa 1991), expresión de genes (Ivanova, Dimos et al. 2002), marcadores (Morrison, Hemmati et al. 1995; Sanchez, Holmes et al. 1996), y regulación molecular (Pina and Enver 2007). Incluso se ha demostrado que ciertos genes, como Sox17, son necesarios para la formación de células fetales pero no de las adultas (Kim, Saunders et al. 2007), y su sobreexpresión en células adultas puede transformarlas en células con características fetales (He, Kim et al. 2011). La transición de CMHs fetales a adultas ocurre entre 2-3 semanas después del nacimiento en los ratones (Kikuchi and Kondo 2006; Bowie, Kent et al. 2007) (Figura 5). Aunque los mecanismos no se conocen muy bien, la mayor capacidad de injerto de las células derivadas de hígado fetal está probablemente asociada con su estado de

proliferación, en comparación con la naturaleza quiescente de las CMHs derivadas de médula ósea adulta (Bowie, Kent et al. 2007).

1.5.1. Diferencias en la expresión de marcadores. .

Las CMHs procedentes del hígado fetal y las de la médula ósea difieren en la expresión de marcadores en su superficie. Así, las células fetales Lin- Mac1+ son las únicas con capacidad de reconstitución a largo plazo, mientras que las CMHs de médula ósea son Mac1- (Morrison, Hemmati et al. 1995). De forma similar, las células madre de hígado fetal son CD144 (VE-cadherin), pero la expresión de este marcador declina a partir de día 16,5 de desarrollo, no expresándose en las CMHs adultas (Kim, Yilmaz et al. 2005). Mediante ensayos de microarray se han identificado genes específicos de CMHs fetales y adultas (Ivanova, Dimos et al. 2002).

1.5.2 Capacidad de diferenciación.

Las células madre fetales generan una progenie de células linfoides diferentes a las de adulto. Así, dan lugar preferentemente a linaje T $\alpha\beta$ (Ikuta and Weissman 1991). También generan linfocitos B independientes de IL-7 (Kikuchi and Kondo 2006), y preferentemente de tipo B1 (Hardy and Hayakawa 1991; Ghosn, Sadate-Ngatchou et al. 2011), y su progenie en ensayos de trasplante es mayoritariamente mieloide (Bowie, Kent et al. 2007).

1.5.3. Diferencias funcionales.

Se conoce desde hace tiempo que las células fetales son proliferativas frente a las CMHs de adulto mayoritariamente quiescentes (Morrison, Hemmati et al. 1995). En relación con esta característica, las CHMs fetales presentan una incrementada capacidad de autorenovación en trasplantes (Bowie, Kent et al. 2007), necesitan menor concentración de SCF para proliferar (Bowie, Kent et al. 2007), y en general, pueden repoblar más eficientemente en ensayos de trasplante. (Guenechea, Gan et al. 2001; McKenzie, Gan et al. 2006)

Diferencias similares se han obtenido en humanos. Mediante ensayos de trasplante en ratones inmunodeficientes NSG, una sola CMH procedente de AGM humano es capaz de generar, al menos, 300 CMHs hijas en unos ocho meses. Para conseguir el mismo efecto con células de médula ósea adulta, son necesarias muchas más CMHs (Liu, Sato et al. 2010). Datos más recientes sugieren que un 40% de quimerismo en sangre puede conseguirse ocho meses post-trasplante de 10-20 CMHs en un ratón NSG (Notta, Mullighan et al.). Mediante estudios estocásticos se ha mostrado que las CMHs adultas humanas se replican cada 40 semanas (Catlin, Busque et al. 2011). Los resultados obtenidos por Ivanovs y otros investigadores han demostrado que la expansión de CMHs en el embrión humano ocurren cada 3,5-4 semanas (Ivanovs, Rytsov et al. 2011). Esta enorme capacidad regenerativa de las CMHs tempranas es consistente con el hecho de que sean las fundadoras del sistema hematopoyético adulto.

Un aspecto importante recientemente descrito, es que algunas de estas propiedades cambian de forma abrupta y altamente coordinada en un periodo de desarrollo restringido, entre las semanas 1 a 4 tras el nacimiento. Las propiedades que cambian son: el estatus de ciclo celular, su capacidad de autorenovación tras el trasplante, y su capacidad de diferenciación mieloide (Bowie, Kent et al. 2007). De forma extraordinaria, se ha visto que, en trasplantes, las células fetales cambian estas propiedades y se convierten en células adultas en el mismo periodo de tiempo que lo harían en condiciones de no trasplante. Estos datos sugieren que existen programas intrínsecos de la célula que dependen de su progresión en el desarrollo más que del nicho. También existen diferentes tipos de células fetales en cuanto a su potencial de diferenciación mieloide/linfoide (CHM $\alpha\alpha\alpha y\alpha$) (Benz, Copley et al.). Sin embargo, la diferencia en la predominancia de un tipo u otro depende de la llegada a la médula y por tanto, no tiene un control temporal intrínseco como la capacidad proliferativa y de autorenovación.

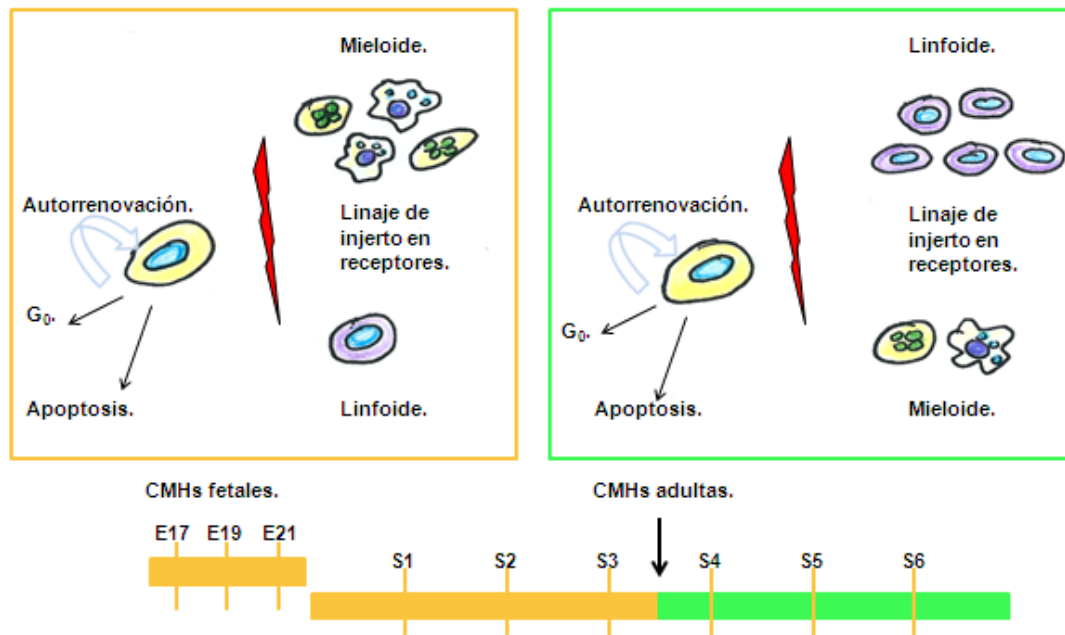


FIGURA 5. Transición de CMHs fetales a CMHs adultas. Se producen cambios en las propiedades de proliferación, auto-renovación y diferenciación a linaje. Las CMHs de ratón fetal o neonatal, son células que proliferan y se auto-renuevan con divisiones simétricas, y dan lugar a células de linaje mieloide cuando se trasplantan en animales irradiados. Entre la tercera y cuarta semana tras el nacimiento, las CMHs son sometidas a cambios para generar CMHs adultas. Las CMHs adultas son quiescentes o proliferan más lentamente, participan en divisiones asimétricas, y generan linaje predominantemente linfoide cuando se trasplantan en animales irradiados. (Pina and Enver 2007).

1.5.4. Factores de transcripción y otras moléculas que afectan de forma diferencial a las CMHs fetales y adultas.

Estos caracteres distintivos parece que están respaldados por programas genéticos y también existen diversas mutaciones que afectan a las CMHs adultas pero no a las fetales. Entre estas están Bmi1 (Park, Qian et al. 2003), Gfi1, y Tel/Etv6 (Hock, Meade et al. 2004).

Así mismo, existen mutaciones que afectan a las CMHs fetales pero no a las adultas. RUNX1 fue el primer factor de transcripción descrito como necesario exclusivamente para la formación de la hematopoyesis definitiva en el embrión de ratón. Los ratones mutantes para RUNX1 mueren a día E12,5-13,5 por sangrado masivo en los espacios del ventrículo cerebral. No se observan células hematopoyéticas en el hígado fetal y ello es debido a que se anula completamente la producción de células de sangre en la aorta dorsal, las arterias umbilicales y vitelinas y en el saco vitelino (North, Gu et al.

1999). La falta de RUNX1 distingue claramente entre la hematopoyesis primitiva y definitiva. Sin embargo, no permite distinguir entre la contribución de las CMHs y progenitores a la sangre intraembrionica. El análisis de los mutantes muestra que RUNX1 no es necesario para el mantenimiento de las CMHs en la médula ósea adulta (Ichikawa, Asai et al. 2004).

Sox17. Se ha demostrado que Sox17 se expresa únicamente en las CMHs fetales y neonatales del sistema hematopoyético, y que su expresión desaparece conforme las CMHs adquieren su identidad adulta (Kim, Saunders et al. 2007). La expresión ectópica de Sox17 en la médula ósea adulta aumenta su capacidad de producir multilínea a largo plazo en ratones irradiados, con un incremento en la producción de células mieloides, eritroides y plaquetas, algo similar a lo que hacen las CMHs del hígado fetal (He, Kim et al.). Esto evidencia la existencia de un programa transcripcional específico de las CMHs fetales.

Lin 28b se expresa en altos niveles en los progenitores linfoides fetales, y su sobreexpresión en progenitores hematopoyéticos adultos reactiva la diferenciación linfóide similar a la fetal (Yuan, Nguyen et al.). También se ha demostrado que Lin28b se expresa de forma diferente en las CMHs fetales y adultas, lo que sugiere que podría regular diferencias entre sus estados de desarrollo. Dado que en *C.elegans* regula el tiempo de desarrollo inhibiendo el procesamiento del microRNA let-7 (Bussing, Slack et al. 2008), esta ruta de señalización podría servir como un regulador de los cambios en las propiedades celulares durante el desarrollo conforme los animales evolucionan del estado fetal al adulto.

En general, como se muestra en el apartado anterior, muchos de los estudios sobre regulación molecular abordan el efecto de factores de transcripción. Considerando el importante papel que tiene la interacción de las CMHs con el nicho y su función en activación y diferenciación, en este trabajo de tesis se aborda el estudio de una ruta de señalización: Notch, en particular la función del receptor Notch1. A continuación, se describe la ruta y los datos previos que se conocen sobre el efecto de Notch en hematopoyesis.

2. LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH.

2.1. Introducción.

Notch fue identificado por primera vez en *Drosophila* en 1914 por Christine Dexter, (Wikipedia), y recibe su nombre por las muescas (notch), que se formaban en las alas de las moscas mutantes para Notch. Posteriormente, el clonaje y análisis molecular del gen lo realizaron los grupos de S. Artavanis-Tsakonas y M Young (Wharton, Yedvobnick et al. 1985). Desde entonces, se ha estudiado mucho sobre este gen, y se sabe que regula una amplia variedad de procesos de desarrollo como la neurogénesis, miogénesis, hematopoyesis, y segregación de los somitas, entre otros.

La ruta de señalización de Notch incluye diferentes proteínas entre las que se encuentran los receptores de Notch, los ligandos de tipo Delta y Jagged, el factor de transcripción RBP-Jk y otros cofactores. Los miembros de la familia Notch están altamente conservados en especies evolutivamente distantes, lo que da idea de su importancia biológica.

La señalización canónica de Notch se produce entre células contiguas, unas expresan el ligando y otras células el receptor. La interacción del ligando con el receptor induce un proceso proteolítico del receptor, y la liberación en el citoplasma del dominio intracelular activo (dominio NIC). NIC se trasloca al núcleo, donde interacciona con el factor de transcripción RBP-Jk y un complejo proteico co-activador. Esta unión permite el inicio de la transcripción de genes regulados por Notch.

2.2. Los Receptores.

La ruta de señalización Notch en mamíferos está compuesta por cuatro receptores transmembrana (Notch1 a Notch4), que contienen múltiples EGF-like (factor de crecimiento epidermal), seguido de una zona conservada rica en cisteína Notch/Lin 12 en el dominio extracelular y seis CDC 10/ankirina en el dominio intracelular involucrado en el mantenimiento de la estructura heterodimérica mediante puentes disulfuro, y evitando la activación en ausencia de ligando (Weng, Ferrando et al. 2004) (Figura 6).

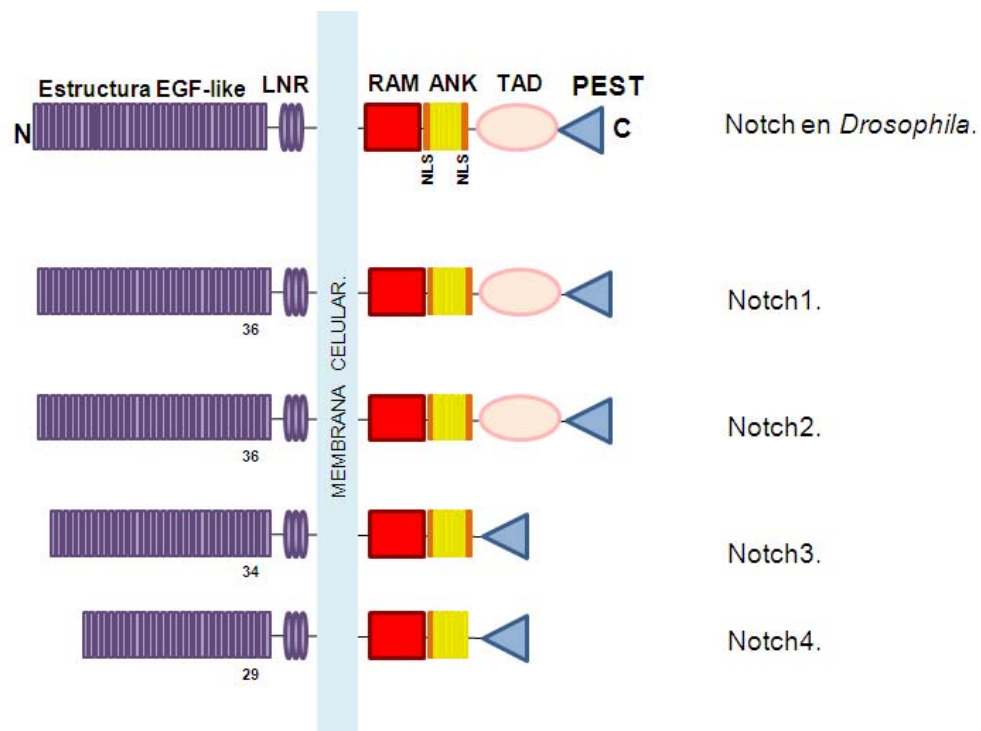


FIGURA 6. Representación esquemática del receptor Notch en *Drosophila* y los cuatro receptores Notch en mamíferos. Notch se expresa en la superficie celular como heterodímeros compuestos de un largo dominio extracelular no unido covalentemente al dominio intracelular. El dominio extracelular de todos los receptores Notch contiene EGF-like y 3 LNR (lin Notch repeat). El dominio intracelular contiene el RAM23 (sitio de alta afinidad de los factores de transcripción), y siete sitios ANK (Ankirina), necesarios para la transmisión de señales. Además, los receptores 1-3 tienen dos señales de localización nuclear (NLS), mientras que el 4 sólo tiene uno. NLS es necesario para dirigir el dominio intracelular al núcleo donde el dominio de activación transcripcional (TAD) activa la transcripción. Notch3 y 4 no tienen dominio TAD. Todos los receptores contienen una región rica en prolina, glutamato, serina y treonina en C-terminal (PEST), que es necesaria para la degradación

2.3. El Dominio Intracitoplasmático de Notch.

El dominio intracitoplásmico de Notch (NIC), es considerado la forma activa de esta molécula y está compuesto por un sitio de alta afinidad (RAM), que media la interacción con RBP-Jk (también denominado CSL), varios sitios ankirina (ANK), el dominio de activación de la transcripción (TAD), y una zona rica en prolina, glutamato, serina y treonina (PEST), necesaria para la degradación (Kovall and Blacklow ; Kopan and Ilagan 2009).

Mutaciones en las zonas ANK y TAD están involucradas en el desarrollo de leucemias tipo T que se relacionan con el receptor Notch1, mientras que los dominios RAM y PEST no son esenciales en dichos procesos. ANK interacciona con factores de transcripción posiblemente desplazando a los correpresores, y TAD sirve para atraer moléculas coactivadoras. Por otro lado, la delección de TAD, incluyendo la zona PEST, atenúa pero no previene la leucemia tipo T (Aster, Xu et al. 2000).

El dominio PEST contiene múltiples sitios de fosforilación que son importantes para el control de la estabilidad de NIC, y sirve de señal para la ubiquitilación subsiguiente. Además, la quinasa ciclina dependiente 8 (CDK8), fosforila NIC y esta modificación es importante tanto para la actividad como para el descenso en los niveles de NIC (Andersson, Sandberg et al. ; Fryer, White et al. 2004).

2.4. Los Ligandos de Notch.

Los ligandos de Notch, también son proteínas transmembrana (Figura 7). Se conocen cinco ligandos en mamíferos, tres ortólogos de Delta en *Drosophila* (Delta 1, 3 y 4), y dos de Serrate en *Drosophila* (Jagged1 y Jagged2). El dominio extracelular de los ligandos se caracteriza por la presencia de un dominio N terminal (NT), seguido de un dominio Delta/Serrate/LAG-2 (DSL), y múltiples EGF-like ordenados en tándem. Los dominios DSL y NT, y los dos primeros EGF contienen las proteínas Delta y OSM-11 (DOS), necesarias para la unión al receptor Notch. El dominio NT se subdivide en una región que contiene seis residuos cisteína conservados evolutivamente (N1), y otra región sin cisteína (N2). Los ligandos Jagged contienen una región rica en cisteína adicional que no tienen los ligandos Delta (D'Souza, Meloty-Kapella et al. 2010).

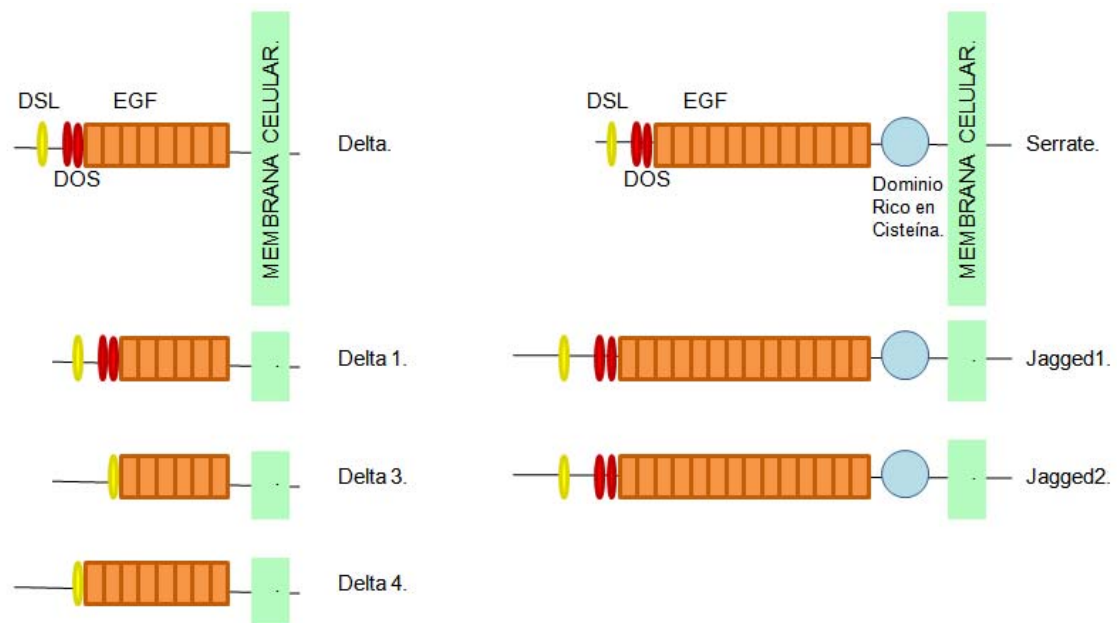


FIGURA 7. Esquema representando los ligandos de Notch en mamíferos. A la izquierda se muestran los ligandos Delta 1, 2 y 3, ortólogos de Delta en *Drosophila* (éste último representado en la parte superior). A la derecha se muestra el esquema de los ligandos Jagged1 y 2 ortólogos de Serrate en *Drosophila* (mostrado en la parte superior). Las proteínas Delta y OSM-11 (DOS), son necesarias para la unión a Notch. DSL representa el dominio Delta/Serrate/LAG-2.

2.5. Regulación de la Ruta de Señalización Notch.

La interacción de Notch con sus ligandos resulta en la activación del dominio intracelular como factor de transcripción. En esta ruta, se pueden encontrar distintos niveles de regulación como son:

- 1) Modificaciones post-transcripcionales del receptor, que incluyen modificaciones en la glicosilación de la parte extracitoplásmica y modificaciones en la fosforilación, ubiquitinización, hidroxilación y acetilación del dominio NIC.
- 2) Regulación de la interacción receptor-ligando.
- 3) Regulación de la interacción del receptor en el núcleo.

4) Degradación del receptor.

5) Moléculas diana.

2.5.1. Modificaciones postranscripcionales de Notch.

Los receptores de Notch sufren diferentes modificaciones postranscripcionales en el retículo endoplasmático y el aparato de Gogi antes de llegar a la membrana.

-Glicosilación: Las moléculas involucradas en este proceso que se han descrito son Pofut1 (O-fucosiltransferasa1), Rumi (O-glucosiltransfera) y proteínas Fringe (transferasa beta1, 3-GlcNAc) (Acar, Jafar-Nejad et al. 2008; Stanley and Okajima 2010; Fernandez-Valdivia, Takeuchi et al. 2011). Las modificaciones suelen darse en el dominio EGF-like. La adición de O-fucosa por la proteína Pofut1, aunque no es necesaria para la transducción de la señal del receptor Notch *per se* (Okajima, Reddy et al. 2008), si hace falta para la glicosilación subsiguiente del receptor por las proteínas Fringe (lunatic fringe, manic fringe y radical fringe en mamíferos). Esta glicosilación modula la respuesta del receptor Notch a los ligandos Delta frente a los ligandos Jagged. Fringe potencia la interacción con Delta 1 y reduce la respuesta a Jagged1 (Morrison, Perez et al. 2000). Aún se está investigando cómo afecta la glicosilación al receptor Notch y su interacción con los diversos ligandos en contextos celulares determinados. Por ejemplo, una proteína Fringe, la condroitin sulfato sintetasa 1 (CHSY1), parece suprimir la señalización Notch; la falta de CHSY1 permite la hiperactivación de Notch (Tian, Ling et al.).

-Fosforilación: la fosforilación de las proteínas Notch se correlaciona de forma indirecta con la activación de Notch y la traslocación al núcleo. La glicógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), puede unirse y fosforilar al receptor Notch 2 tanto *in vitro* como *in vivo*. La fosforilación del dominio rico en serina/treonina es fundamental para regular la diferenciación celular citoquina-específica. Sólo el receptor Notch2 procesado sirve de sustrato para la quinasa, lo que sugiere que la fosforilación por GSK-3 β regula de forma específica la forma activa de Notch (Espinosa, Ingles-Esteve et al. 2003).

-Ubiquitinilación: los receptores que no se unen a ligando son endocitados y, o bien devueltos a la superficie celular, o bien degradados por lisosomas. Los endosomas juegan un papel fundamental al prevenir una activación inadecuada del receptor

Notch. Se cree que el ambiente ácido del compartimento endocítico donde Notch es atrapado, es suficiente para promover la disociación del heterodímero Notch y copian la unión a ligando. Si la rotura por la γ -secretasa que posiblemente tiene lugar en los endosomas, genera moléculas NIC estables o lábiles aún no se conoce (Le Bras, Loyer et al. 2011). De entre las cinco familias de ligasas E3 implicadas en la ubiquitinilación de Notch, SEL-10/Fbw7 puede ubiquitinar NIC para promover su degradación proteosómica (Hubbard, Wu et al. 1997; Wu, Lyapina et al. 2001). Otras ligasas E3 que ubiquitinan Notch regulan su señalización, son la ligasa E3 RING finger Deltex (Dx), y c-Cbl, y también dos dominios HECT con las ligasas E3 Supresor de Deltex (Sudx), y Nedd4. Nedd4 y c-Cbl están implicadas en la selección y degradación lisosomal de Notch inactivo. Niveles incrementados de Su (dx) y Nedd4 provocan fenotipos similares a los causados por la falta de función de Notch en *Drosophila*, por lo que estas ligasas parecen regular Notch de forma negativa (Sakata, Sakaguchi et al. 2004; Wilkin, Carbery et al. 2004). El mismo efecto se observa en mamíferos (Kageyama, Masamizu et al. 2007; Acar, Jafar-Nejad et al. 2008). Sin embargo, aún no se sabe si c-Cbl puede promover la degradación de la molécula completa de Notch1

-Hidroxilación: Notch 1,2 y 3 pueden ser hidroxilados por el factor FIH1. La función no se conoce aún bien, ya que mutantes para FIH1 no presentan una activación sistémica de Notch (Zhang, Fu et al. 2010). Es interesante resaltar que FIH1 es un inhibidor del factor de transcripción HIF1 α que se induce en situaciones de hipoxia. También se ha demostrado que NIC interacciona con HIF1 α . Esta interacción conduce al reclutamiento de HIF1 a las zonas reguladoras de genes inducidos por Notch (Gustafsson, Zheng et al. 2005). La hipoxia estabiliza los niveles de NIC induciendo la activación de la ruta, sin embargo, no se conocen aún los detalles moleculares. Considerando que situaciones de hipoxia inducen la autoreplicación en CMHs (Miharada, Karlsson et al. 2011), los mecanismos podrían ser compartidos con Notch.

Acetilación: La acetilación del dominio intracelular de Notch controla la amplitud y la duración de la respuesta de Notch por alteración de la proteína Notch. La deacetilasa SIRT1 NAD (+)-dependiente, se une a NIC y la inestabiliza. Así, las células endoteliales que no tienen actividad SIRT1, están más receptivas a la señalización Notch, lo que supone un crecimiento defectuoso y aumento de la expresión de los

genes diana de Notch en respuesta al estímulo del ligando DELTA 4. La inactivación de SIRT1 en ratón reduce la formación de redes vasculares (Guarani, Deflorian et al.).

2.5.2. Unión ligando receptor.

La unión con el ligando permite la rotura cerca de la región transmembrana del fragmento C-terminal de la proteína, lo que resulta en la liberación del dominio intracelular (Notch IC), que es la forma activa de Notch, seguido de su traslocación al núcleo (Schroeter, Kisslinger et al. 1998).

El sitio de ruptura S1, es procesado por una convertasa similar a la furina en el aparato de Golgi. En la superficie celular, Notch puede interaccionar con sus ligandos, lo que resulta en la exposición del sitio de rotura extracelular S2 en el que actúan proteasas transmembrana de la familia ADAM/TACE (desintegrina y metalopeptidasa/tumor factor de necrosis y enzima de conversión) b(Mumm and Kopan 2000; Nichols, Miyamoto et al. 2007). Como resultado, el dominio intracelular de Notch es liberado en el interior celular donde sufre otras dos roturas, S3 y S4, mediadas por la actividad de un complejo multiproteico que contiene actividad gamma secretasa. Este complejo contiene presenilina, nicastrina, Pen-2 y Aph-1 (Kopan and Turner 1996; Schroeter, Kisslinger et al. 1998; Wolfe 2006). Estudios estructurales sugieren que los receptores Notch se encuentran en un estado proteasa-resistente y que son necesarios cambios conformacionales inducidos para el sitio ADAM y activar la proteólisis (Musse, Meloty-Kapella et al. 2012).

Además de activar la ruta de Notch, los ligandos pueden ejercer un efecto inhibitorio que depende de la concentración. Así, cuando los niveles de ligando son muy altos, inducen inhibición de la ruta, por el contrario, cuando los niveles son bajos se favorece la activación de la ruta (Micchelli, Rulifson et al. 1997). Una forma de regular el ligando es por endocitosis. La endocitosis es necesaria tanto en el caso del ligando como del receptor (Brou 2009). La endocitosis de los ligandos en la célula que envía la señal es modulada por Mind bomb (Mib) (Itoh, Kim et al. 2003; Koo, Lim et al. 2005). Mutantes en esta molécula provocan una constante activación de las CMHs, tanto endógenas como CMHs trasplantadas en mutantes Mib. Estos animales desarrollan una enfermedad hemato-proliferativa (Kim, Koo et al. 2008).

La endocitosis también está regulada por la actividad de la ligasa ubiquitina E3. Esta regulación controlada de la endocitosis no es exclusiva de la ruta Notch, sino que se ha observado también en las rutas de señalización EGF y TGF- β (Di Guglielmo, Le Roy et al. 2003). Normalmente, los ligandos de Notch ubiquitinilados son llevados a endosomas con lípidos, mientras que los no ubiquitinilados van a endosomas que no los contienen (Heuss, Ndiaye-Lobry et al. 2008).

2.5.3. Interacción NIC/RBP en el núcleo celular.

El dominio intracelular de Notch es traslocado al núcleo, donde regula la expresión de diversos genes diana mediante su unión al factor de transcripción RBP-JK, con el que forma un complejo ternario junto con Mastermind (Mam) (Figura 8). La forma activada de Notch (NIC), interacciona con RBP a través del dominio RAM23, una secuencia que fue identificada en el lado N-terminal de la zona de ankirina (Tamura, Taniguchi et al. 1995). En ausencia de NIC, RBP-jk actúa como represor a través de complejos correpresores de histona deacetilasa (HDAC) (Oswald, Kostezka et al. 2002). Estos complejos correpresores, mantienen la cromatina en modo de silencio transcripcional.

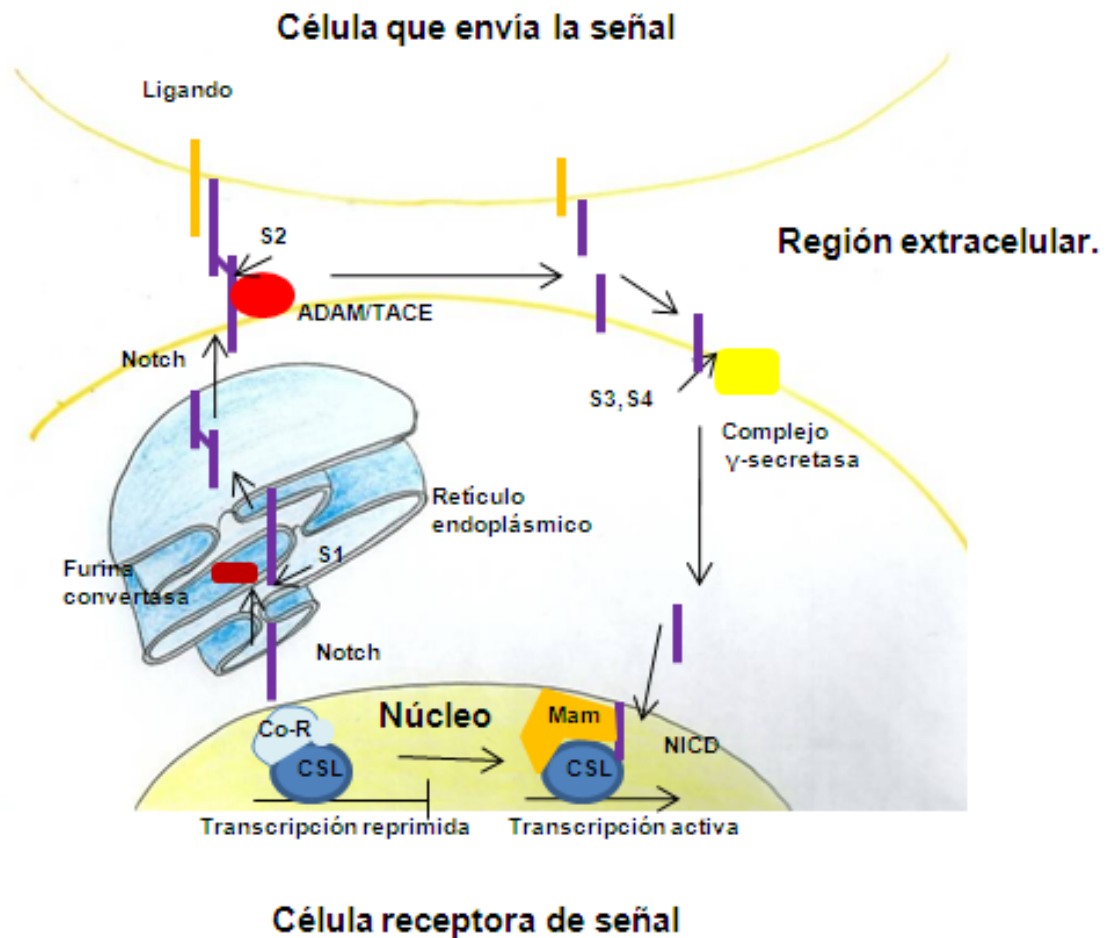


FIGURA 8. La ruta de señalización Notch requiere la interacción célula-célula para que el receptor y el ligando se unan y se active la ruta.

2.5.4. Degradación de NIC.

La actividad transcripcional mediada por Notch es reducida mediante la degradación de NIC. El mecanismo que detiene la señal incluye Mastermind y una proteína denominada SKIP. Ambas atraen quinasas que fosforilan específicamente a NIC en los dominios TAD y PEST, lo que produce la degradación de Notch y detiene la señal (Fryer, White et al. 2004) (Figura 9).

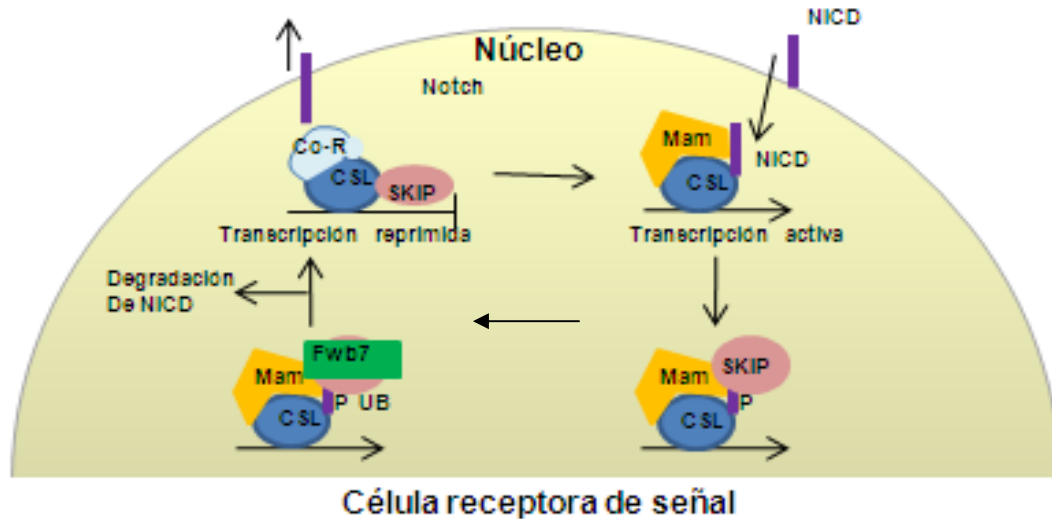


FIGURA 9. Ruta de degradación de Notch. La proteína SKIP junto con Mam atraen quinasas que fosforilan NIC, con lo que este se hace susceptible a la ubiquitinilación por Fwb7/Sel10 lo que favorece la degradación de la proteína.

2.5.5. Transcripción de genes diana de Notch.

La traslocación de NIC al núcleo favorece la transcripción de diferentes genes, entre los que destaca la familia Hes (Hairy/Enhancer of Split), que puede mediar la acción de Notch en un amplio rango de células y organismos (Iso, Kedes et al. 2003; Kageyama, Ohtsuka et al. 2007). Se ha demostrado que la activación de Notch en el AGM provoca un aumento en la transcripción de Hes1 y otros genes relacionados con Hes (Robert-Moreno, Espinosa et al. 2005). Las proteínas Hes son represores transcripcionales que incluyen los genes diana de Notch Hes1, Hes3, Hes7 y otros relacionados con Hes, HRT1 y HRT2 (Kageyama, Ohtsuka et al. 2007). En el sistema hematopoyético, Hes1 actúa normalmente en el desarrollo de los linfocitos T, y está implicado en el desarrollo de leucemias tipo T por la activación de Notch (Espinosa, Cathelin et al. 2010; Wendorff, Koch et al. 2010). Se ha demostrado que Hes es esencial para regular los niveles de GATA2 en los precursores del AGM y generar células hematopoyéticas funcionales (Guiu, Shimizu et al.).

Notch1 también regula directamente la expresión de GATA2 (Robert-Moreno, Espinosa et al. 2005). Este gen está regulado por dos promotores en ratón. El promotor proximal (IG), y el distal (IS), activo específicamente en tejido hematopoyético. GATA 2 se expresa en la zona del AGM, donde comienza la

hematopoyesis (Minegishi, Ohta et al. 1999). Este gen parece estar regulado por Notch1 y Hes1. Así, la expresión ectópica de NIC en el AGM no incrementa la expresión de GATA2, lo que puede ser explicado por una regulación negativa del promotor GATA2 por Hes1. Por otro lado, los niveles de GATA2 en embriones mutantes para Jagged1 (ligando de Notch necesario para la hematopoyesis en el AGM), están disminuidos, mientras que aumentan en los embriones mutantes para Hes1. Esto parece indicar que Notch y Hes corregulan la expresión del promotor GATA2 *in vitro* de forma opuesta (Guiu, Shimizu et al. 2013).

Otro gen diana de Notch es c-Myc. Se ha visto que los niveles de este gen están aumentados a consecuencia del incremento en los niveles de Notch en leucemias de tipo T (Weng, Millholland et al. 2006). El incremento en los niveles de Notch1 puede incrementar la actividad del promotor c-Myc, que a su vez incrementa el número de CMHs (Satoh, Matsumura et al. 2004).

2.6. Funciones de Notch.

En general, Notch es un factor clave en la generación de la diversidad celular tisular mediada por interacción célula-célula. Notch puede, o promover la diferenciación, o mantener un estado indiferenciado. Para explicar como Notch interviene en la generación de la diversidad celular, se han propuesto dos modelos: inducción lateral e inhibición lateral.

2.6.1. Inducción lateral.

En la inducción lateral, la señalización de Notch se produce entre células no equivalentes, es decir, en estadios de diferenciación o tipos celulares diferentes. La señalización induce diferenciación unidireccional. Es un proceso asociado con la división asimétrica celular y, por tanto, involucra mecanismos del control de la polaridad celular. En mamíferos, un clásico ejemplo es la formación de somites (Ferjentsik, Hayashi et al. 2009). También se ha propuesto que Notch intervenga en la diferenciación de células madre empleando este modelo mecánico (Figura 10)(Chiba 2006).

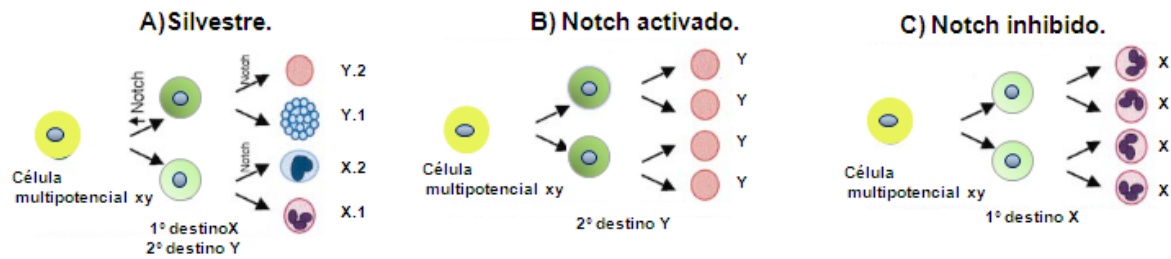


FIGURA 10. Inducción lateral. La expresión de Notch a lo largo de sucesivas decisiones celulares influencia el número y tipo de células generadas a partir de un progenitor multipotente. **A)** Una célula normal puede dar lugar a células de cuatro tipos, en cada división, la célula hija que expresa menos Notch elige el 1^{er} destino y la que expresa más adopta la 2^a opción. Cuando la expresión de Notch se altera hay sobreproducción de un tipo celular a expensas de los otros. **B)** Cuando se pierde la expresión de Notch, todas las células adoptan el destino 1º (X), y sólo se producen células X. Si la expresión de Notch aumenta las células hijas adoptan el 2º destino generando sólo células Y **C).**

2.6.2. Inhibición Lateral.

En la inhibición lateral, la señalización de Notch se produce entre células equivalentes, que tienen el mismo nivel de receptores y ligandos de Notch. Durante el desarrollo, emergen grupos celulares que se supone tienen un potencial de desarrollo similar, pero sólo algunas células del grupo adquieren ese potencial. Aquéllas que lo adquieren suprimen este potencial en sus células vecinas, esto es lo que se conoce como inhibición lateral (Gierer 1974). Las células que producen altos niveles del ligando de Notch (la “célula emisora de señal”), fuerza a sus células vecinas a activar Notch. La activación de Notch induce la pérdida de ligandos en la célula activada por un mecanismo de retro-regulación, amplificando así el proceso de diferenciación. Un ejemplo clásico lo constituye la diferenciación neuroepitelial en *Drosophila*, donde la activación de Notch mantiene el estatus epidérmico, e inhibe la diferenciación neuronal. La célula emisora de señal (que no activa Notch), es la que se diferencia a neurona (Parks, Huppert et al. 1997). En mamíferos este mecanismo se da en neurogénesis y miogénesis, entre otros (Appel, Givan et al. 2001). Recientemente, se ha demostrado que los niveles de Hes son esenciales en el proceso de inhibición lateral mediado por Notch que se lleva a cabo en las células del pelo de la oreja (Tateya, Imayoshi et al. 2011).

3. NOTCH1 Y LA HEMATOPOYESIS.

3.1. Introducción.

Notch juega un importante papel en la determinación del destino celular y en el mantenimiento de los progenitores hematopoyéticos. Diferentes ligandos y receptores se expresan en células madre y células progenitoras de linfocitos T, B y células mieloides (Radtke, Wilson et al. 2005). También es importante el estudio del papel de Notch en hematopoyesis en el ámbito clínico, ya que se sabe que mutaciones en la activación de esta ruta de señalización están involucradas en el 50% de los casos de leucemia. Sin embargo, los resultados sobre es estudio de los mecanismos de acción son controvertidos y en ocasiones contradictorios, entre otras causas, debido a los diferentes efectos producidos por los niveles de activación y el contexto (léase nicho) de interacción celular (Bigas and Espinosa 2012).

3.2. Notch en las Células Madre Hematopoyéticas Adultas.

En el modelo clásico de neurogénesis en *Drosophilla*, se ha demostrado que Notch está involucrado en el mantenimiento del estado indiferenciado celular. La célula que envía la señal (incremento de ligando) activa (activación de Notch) en la vecina el factor “Enhancer of Split”, que reprime genes proneuronales. Las células que envían la señal se diferencian a neuronas, y las que la reciben no se diferencian. En ausencia de Notch, las células no se diferencian (Parks, Huppert et al. 1997). Mecanismos similares se cree que intervendrían en el sostenimiento de diferentes tipos de células madre en ratón: neuronales (Kageyama, Ohtsuka et al. 2008); musculares (Vasyutina, Lenhard et al. 2007); del folículo piloso (Yamamoto, Tanigaki et al. 2003), incluyendo las células madre hematopoyéticas. Sin embargo, el papel de Notch en células madre hematopoyéticas ha generado resultados controvertidos. En general, los efectos de la activación de Notch en CMHs adultas inducen un incremento de progenitores. Por el contrario, muchos trabajos sobre la falta de función de Notch no encuentran un fenotipo (Maillard, Koch et al. 2008), aunque más recientemente, algunos datos apuntan hacia una incontrolada producción de células mieloides (Klinakis, Lobry et al.

2011; Bigas and Espinosa 2012).

3.2.1. Activación de Notch en células madre hematopoyéticas.

La manipulación de la activación de Notch en poblaciones de células madre y progenitores, se ha abordado con diferentes estrategias. *In vitro*, mediante el empleo de diferentes ligandos, bien expresados en líneas celulares en cocultivos con progenitores humanos Lin-CD34+, o de ratón LSK provenientes de cordón umbilical ó médula ósea (Varnum-Finney, Purton et al. 1998), endoteliales (Jag1, Jag2, Dlk1 y Dlk4) (Butler, Nolan et al. 2010), solubles como Jag1 humano (Karanu, Murdoch et al. 2000), o inmovilizados Dlk1^{ext-IgG} (Varnum-Finney, Brashem-Stein et al. 2003). También se ha inducido activación autónoma de ligando incrementando los niveles citoplásmicos de NIC (Varnum-Finney, Wu et al. 2000; Stier, Cheng et al. 2002), o de genes diana de Notch (Hes1, Kunisto, Chiva et al. 2003). En todos estos experimentos, la activación de Notch resulta en un incremento del número de progenitores *in vitro* incluyendo células madre hematopoyéticas. En general, en estos experimentos la manipulación de Notch se realiza mediante el empleo de vectores de muy alta expresión. Otros experimentos que han empleado niveles de expresión más moderados *in vivo* usando animales Rosa26-LSC-ICN-GFP que expresan NIC de forma inducida cuando se cruzan con ratones Mx-cre seguido de inyección de activador pl-pC, han mostrado que se induce en las células madre una pérdida de autorenovación y, por tanto, de LTR-HSC a largo plazo (Chiang, Shestova et al. 2013). Por tanto, estos datos muestran que diferentes niveles de activación pueden determinar la expansión, diferenciación o extinción de las CHMs y que el contexto *in vitro* o *in vivo* da lugar a diferentes efectos.

3.2.2. Efecto de la falta de función de Notch1.

El análisis de ratones transgénicos con una forma dominante negativa del coactivador Mastermind (que bloquea toda la señalización Notch), o de ratones con falta de RBPj, Jag1, Notch1, o Notch2, muestran que Notch no es indispensable para el mantenimiento de las CMHs en la médula ósea adulta en condiciones fisiológicas (Mancini, Mantei et al. 2005; Maillard, Koch et al. 2008). Otros experimentos, que emplean mutantes para proteínas involucradas en la internalización de la forma activa

NIC (mutantes de nicastrina), y en dobles mutantes Notch1; Notch2, demuestran una expansión de células mieloides. En estos experimentos, no queda claro si el efecto observado es consecuencia directa de la falta de función de Notch sobre las CMHs o sobre los precursores mieloides (Klinakis, Lobry et al. 2011).

3.2.3. Notch en el nicho de la médula ósea.

El mantenimiento y diferenciación de las CMHs se ve influenciado por el nicho que las rodea. Mediante el empleo de ratones transgénicos capaces de producir altos niveles de receptores PTH/PTHrP para la hormona paratiroidea en los osteoblastos del nicho, se ha visto que estas células son inducidas a producir altos niveles del ligando Jagged1 y, simultáneamente, se produce un aumento en el número de CMHs. Estas CMHs presentan un incremento en los niveles de Notch1 *in vivo*. Además esta actividad es inhibida por el tratamiento con γ -secretasa, lo que indica que los osteoblastos pueden regular el nicho de las CMHs, e influenciar en su función mediante la activación de Notch (Calvi, Adams et al. 2003). Sin embargo, la interacción PTH/PTHrP también modula otros factores importantes para las CMHs, como BMP, que probablemente también estén involucrados en el incremento de CMHs.

La inactivación de Mind bomb-1 (Mib1), esencial para la endocitosis del ligando de Notch, provoca el desarrollo de una enfermedad mieloproliferativa. Se ha demostrado que este efecto ocurre cuando Mib1 está ausente en las células del nicho, pero no en las CMHs. Así, el trasplante de médula ósea silvestre en el microambiente mutante para Mib-1 provoca una enfermedad mieloproliferativa *de novo*. Sin embargo, el trasplante de CMHs Mib1 mutantes no tiene repercusiones patológicas (Kim, Koo et al. 2008). Esto indica que la enfermedad proliferativa es resultado del efecto de la alteración de la señalización Notch en las células del microambiente, no hematopoyéticas. La expresión de Notch en el nicho influye en el mantenimiento de la hematopoyesis normal.

3.3. Notch Durante la Embriogénesis.

3.3.1. Notch1 en la hematopoyesis definitiva.

Como se ha indicado anteriormente, la hematopoyesis embrionaria puede dividirse en hematopoyesis primitiva, que ocurre en el saco vitelino, y hematopoyesis definitiva, que se inicia en el embrión en la región AGM. Más recientemente, se ha puesto de manifiesto que las CMHs del AGM se diferencian a partir de células endoteliales de la aorta ventral, denominadas endotelio hemogénico (Boisset, van Cappellen et al. 2010). En 2003, Kumano y sus colaboradores demostraron que Notch1 era esencial para la generación de células hematopoyéticas a partir del endotelio en la zona AGM (Kumano, Chiba et al. 2003). Por el contrario, la hematopoyesis primitiva del saco vitelino no se veía en general afectada, aunque estudios posteriores han puesto de manifiesto que Notch participa en la apoptosis de las células eritroides (Robert-Moreno, Espinosa et al. 2007). Estudios posteriores en los que se emplea agregación de blastocistos mutantes para Notch1, mostraron que es requerido de forma autónoma para el establecimiento de CHMs con capacidad de repoblación a largo plazo (LTR-HSCs) (Hadland, Huppert et al. 2004). Posteriores estudios, empleando mutantes RBP-j (Robert-Moreno, Espinosa et al. 2005), y Mib1 (Yoon, Koo et al. 2008), demostraron el papel esencial de Notch en la determinación de las CMHs en el AGM.

Se ha demostrado que Jagged1, Jagged2 y Delta4 se expresan en el endotelio de la aorta en la región del AGM (Robert-Moreno, Espinosa et al. 2005). Recientemente, empleando mutantes de Jag1 y Jag2, se ha podido demostrar que el efecto de Notch sobre las CHMs es independiente de su función en la especificación arterial. Así, mientras que los mutantes para Jag1 siguen manteniendo marcadores arteriales Ephrine B2 o CD44, la especificación hematopoyética está anulada (Robert-Moreno, Guiu et al. 2008). Por tanto, Notch está directamente asociado con la generación de CMHs, independientemente de su papel en la vasculogénesis.

3.4. Notch en los Linajes Hematopoyéticos.

3.4.1. Función de Notch en la determinación de linaje linfóide T y B.

La ruta de señalización de Notch interviene en la diferenciación de linfocitos. Los linfocitos T se generan a partir de progenitores linfoides que, durante el desarrollo fetal, migran al timo donde se diferencian, expanden y se selecciona el repertorio de receptores específicos para la respuesta inmunológica. En base a la expresión de marcadores como CD25, CD44, CD4 y CD8, entre otros, se han caracterizado diferentes poblaciones de progenitores T. La ruta de señalización Notch afecta al desarrollo de linfocitos T en diferentes niveles. En 1999, Radtke y colaboradores describieron que ratones recién nacidos mutantes condicionales Mx-cre /Notch1 presentaban un timo más pequeño, menor número de células CD4+CD8+ (DP, doble positivas) y un incremento de células CD4-CD8- (DN, doble negativas) (Radtke, Wilson et al. 1999). Posteriormente, se determinó que la población DN contenía un alto número de linfocitos B (Wilson, MacDonald et al. 2001; Visan, Yuan et al. 2006), concluyéndose que Notch1 es necesario para que los progenitores tempranos intratímicos (EPC, early thymic progenitors) se diferencien hacia linfocitos T. En ausencia de Notch se diferencian, por tanto, a linfocitos B (Schmitt, Ciofani et al. 2004). Posteriores experimentos modulando otras moléculas de la ruta de señalización, han corroborando estos datos (Radtke, Fasnacht et al. 2010). Es más, se ha determinado que, en general, Notch1 es necesario para inhibir diversos linajes de los progenitores que migran al timo, incluyendo mieloide, B y dendrítico, con el fin de asegurarse el eficiente desarrollo de linfocitos T (Feyerabend, Terszowski et al. 2009). La inactivación de Notch1 en timocitos de estadio de maduración posteriores (DN3 (CD25+CD44-), no parece afectar a su producción (Wolfer, Bakker et al. 2001). Sin embargo, si afecta a decisiones CD4 vs CD8 y T_a/b vs T_g/d (Robey, Chang et al. 1996; Wolfer, Bakker et al. 2001).

Resultados complementarios se han obtenido activando Notch mediante la expresión de NIC en CMHs, incidiendo en la producción de linfocitos T incluso en ausencia de timo (Pui, Allman et al. 1999), disminuyendo la producción de linfocitos B. Estos animales, sin embargo desarrollaban leucemias fulminantes tipo T, por tanto no estaba clara la diferencia entre un efecto pro tumoral o de diferenciación celular. Más recientemente, datos del grupo de W. Pear demuestran que, empleando expresión de niveles moderados de NIC, se induce una producción ectópica en médula ósea de linfocitos CD4+CD8+, pero no se generan tumores, confirmando la importancia de Notch en la determinación de linfocitos T (Chiang, Shestova et al. 2013).

3.4.2. Relación de Notch con el linaje mieloide.

El papel de Notch en la diferenciación mieloide aún no se conoce bien. La mayoría de los ensayos *in vitro* muestran que la activación de Notch expande las CMHs pero bloquea la diferenciación mieloide. Así, la sobreexpresión de NIC en la línea celular de progenitores mieloides 32D inhibe la diferenciación granulocítica, y permite la expansión de células indiferenciadas (Milner and Bigas 1999; Kumano, Chiba et al. 2001). De forma similar, en otros linajes celulares como la línea eritroide K562, la activación de Notch inhibe la maduración eritroide (Iwasaki and Akashi 2007), y su inhibición provoca diferenciación de células eritroides (Lam, Ronchini et al. 2000).

Sin embargo, otros datos corroboran el papel inhibitorio de Notch en la diferenciación del linaje mielo-eritroide. Así, la activación de Notch a través del ligando Jag1 muestran un aumento del factor de transcripción pro mieloide PU.1, y de la diferenciación mieloide (Schroeder and Just 2000; Schroeder, Kohlhof et al. 2003).

Una posible explicación de los diferentes efectos que tiene Notch sobre las células mieloides, es el hecho de que la función de Notch se ve influenciada por el ambiente. El efecto de Notch sobre la diferenciación linfoide depende de su estado de diferenciación, de si hay citoquinas específicas, o de si la señal Notch se activó por ligandos solubles o inmovilizados.

En humano, se ha visto que la expansión de progenitores de cordón umbilical *ex vivo*, en presencia de Notch pueden recuperar la población de neutrófilos tras un tratamiento mieloablativo más rápido de lo normal (Delaney, Heimfeld et al. 2010).

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.

Las células maduras efectoras del sistema sanguíneo derivan de las células madre hematopoyéticas (CMHs). Las CMHs, se localizan en la médula ósea del adulto y descienden de CMHs generadas durante la vida fetal. Diferentes estudios han puesto de manifiesto que las CMHs constituyen una población heterogénea y que determinadas características como el ciclo celular, transcriptoma y potencial de injerto y diferenciación en trasplantes varían durante el desarrollo. El mantenimiento de una CMH con características fetales en un contexto adulto, puede tener consecuencias negativas para la homeostasis del sistema hematopoyético, siendo, por tanto, importante entender los mecanismos que mantienen ambas poblaciones y modulan su transición.

Una de las rutas de señalización de importancia en el proceso de diferenciación de células madre es la ruta de Notch. Notch está involucrado en la formación de sangre durante el estadio fetal y en la diferenciación de linajes hematopoyéticos. Además, mutaciones en esta ruta están directamente relacionadas con aparición de leucemias. Diversos estudios han determinado el efecto de la activación y falta de función condicional de Notch en CMHs de adulto, sin embargo, se conoce menos la función en células fetales debido, entre otros factores, a la letalidad temprana de los embriones mutantes para componentes de la ruta de señalización de Notch. Uno de estos componentes es Notch1. Notch1 se expresan en la vida fetal y adulta, sin embargo presentan diferentes niveles, un punto potencialmente crítico en la modulación de la función de Notch. Este trabajo propone estudiar la acción de Notch1 en CMHs de origen fetal y determinar si es diferente a la acción sobre CMHs de origen adulto. Para testar esta hipótesis proponemos determinar:

OBJETIVO 1: El efecto de la expresión de una forma activada de Notch1 en células madre hematopoyéticas durante el desarrollo.

OBJETIVO 2: El efecto de la falta de función de Notch1 en células de hígado fetal.

En este punto queremos aclarar que la población seleccionada por marcadores linaje- ckit+ incluye células madre y progenitores hematopoyéticos, pero en general, nos referiremos a ella como CMH.

MATERIALES Y MÉTODOS.

MATERIALES Y MÉTODOS.

LÍNEAS DE RATONES TRANSGÉNICOS EMPLEADAS.

Todos los ratones empleados en este trabajo de tesis tienen un fondo genético híbrido (C57BL/6xCBA). Los animales se mantuvieron a temperatura y humedad relativa constantes en racks ventilados, y con un fotoperiodo artificial de 12 horas en las instalaciones del animalario del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, en la Universidad Pablo de Olavide. Todos los protocolos de manipulación se realizaron cumpliendo la legislación de la Comunidad Europea, con la aprobación del Comité Ético del CSIC y de la Universidad Pablo de Olavide.

1.1 Ratones Transgénicos para la construcción SV40/PLAP/+19 (SCL-3'Enh PLAP). Línea 1791.

El vector de expresión incluye: a) el promotor mínimo SV40 obtenido del plásmido pGL-2 (Promega, Madison, WI, <http://www.promega.com>), b) el segundo intrón de la β globina de conejo, que aumenta la expresión del transgén en ratón, obtenido del plásmido pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA, <http://www.stratagene.com>), c) el gen testigo de la fosfatasa alcalina de la placenta humana (hPLAP), incluyendo la señal de poliadenilación SV40, subclonado a partir del plásmido APpA3, y d) la secuencia reguladora +19 del gen SCL, que incluye un fragmento de ADN genómico de 644pb localizada 19kb en posición 3' del promotor del gen SCL. Este fragmento fue subclonado de la construcción SV/lacZ/+19, e insertado en posición 3' del gen PLAP para generar la construcción SV40/PLAP/+19 (Silberstein, Sanchez et al. 2005), (Figura 12). El vector SCL3'EnhPLAP, dirige la expresión de PLAP en células madre y progenitores hematopoyéticos, así como en una fracción de megacariocitos y osteoblastos y en células endoteliales (Sanchez, Gottgens et al. 1999; Sanchez, Bockamp et al. 2001; Garcia-Ortega, Canete et al. 2010). En este trabajo de tesis, se emplea la línea transgénica L1791. Esta línea también presenta expresión ectópica, entre el 12%-20% de linfocitos T circulantes.

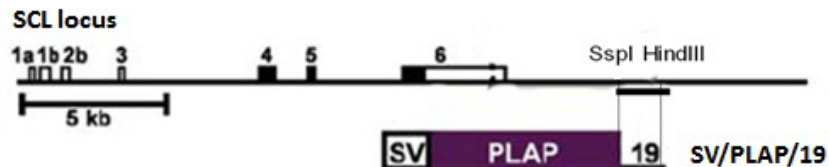


FIGURA 11. Representación del locus SCL. En la parte superior se representan todos los exones (codificantes, en negro, no codificantes en blanco), y la localización del enhancer +19 flanqueado por los sitios de restricción indicados. En la parte inferior, se representa el vector de expresión denominado SCL-3'Enh-PLAP. El vector está compuesto por las secuencias del promotor mínimo del simian virus (SV), la secuencia del gen testigo de la fosfatasa alcalina de la placenta humana (hPLAP) y el enhancer +19, también incluye la señal SV40 de poliadenilación, y el segundo intrón del gen de la β -globina de conejo (que incrementa la expresión génica) (Silberstein, Sanchez et al. 2005).

1.2. Ratones Transgénicos para las Construcciones SCL3'Enh-NIC1 y SCL3'Enh-lacZ. Líneas 197 y 318:

Estas líneas fueron generadas previamente en el laboratorio mediante inyección simultánea de los fragmento linearizados NheI/SalI de los vectores SCL3'Enh-lacZ, y SCL3'Enh-NIC, en pronúcleo de embriones de día 1. Los ratones son viables y la distribución genética de animales transgénicos obtenida en la descendencia es mendeliana. Los animales de ambas líneas son transgénicos para los dos vectores.

El vector SCL3'Enh-lacZ incluye: a) el gen testigo lacZ y la señal de poliadenilación SV40. Fue subclonado del plásmido pSDK lacZpA, dentro del plásmido básico pGL-2 (Promega); b) El promotor endógeno del gen SCL localizado en el exón 4 (fragmento +6E5); y c) El 3'Enhancer del gen SCL, un fragmento de 5.5 kb BglII/BglII localizada 14kb en posición 3' del promotor 1a. El fragmento de 5.5kb fue subclonado en posición 3' del gen lacZ para generar la construcción 6E5/lacZ/3'Enh. La descripción de estos transgénicos ha sido previamente publicada (Sanchez, Gottgens et al. 1999; Sanchez, Bockamp et al. 2001).

El vector SCL3'Enh-NIC incluye el fragmento intracitoplásmico de Notch1 (NIC), de ratón (aa 1751-2293), fusionado a la secuencia de FLAG de 9 aminoácidos en la zona N terminal. Fue obtenido del plásmido pSG5-mNotchIC (cedido por Dr. E. Robey), mediante digestión con EcoRI (fragmento EcoRI de 1.6 kb) (Robey, Chang et al. 1996). El fragmento NIC, fue subclonado en el vector SCL-3'Enh, entre la zona conteniendo la secuencia del promotor +6E5 (fragmento Sau3/NdeI de 2.4 kb), y la

zona conteniendo el enhancer 3'Enh (+18/19) (fragmento BglII/BglII de 5.5 kb) (Figura 12).

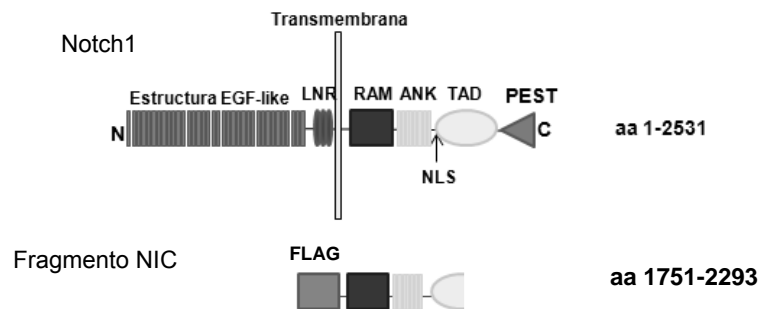


FIGURA 12. Esquema representativo del gen Notch1. En la parte superior se representa el receptor Notch1. Debajo se muestra el fragmento NIC empleado en este estudio. LNR: lin Notch repeat, RAM23, sitio de alta afinidad de los factores de transcripción RBP-Jk; ANK, repeticiones de ankirina necesarias para la transmisión de señales; TAD, dominio activador de transcripción; PEST, región rica en prolina, glutamato, serina y treonina.

La detección de animales transgénicos se realiza mediante PCR de DNA genómico. La localización de los oligonucleótidos (E5 y Nas), dentro del vector SCL-NIC se muestra en la figura 13.

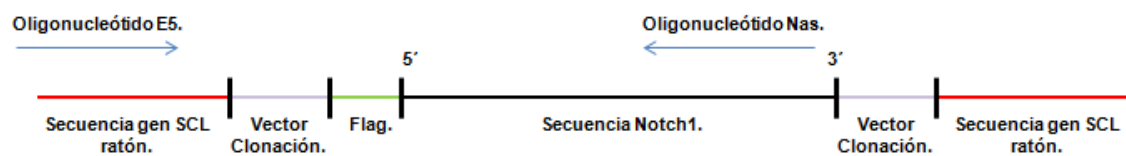


FIGURA 13. Representación de SCL-NIC. Los oligonucleótidos E5 y Nas se emplean para detectar la presencia del transgen en DNA genómico.

1.3. Línea Notch1 lox (Notch1 ^{tm²Rko}/GridJ):

Estos ratones fueron adquiridos en Laboratorios Jackson (E.E.U.U), y llegaron al CABD en Enero de 2008 (Radtko, Wilson et al. 1999).

Para su generación, se diseñó una construcción que permitiera situar un cassette PGK-neomicina flanqueado por sitios loxP por encima del exón 1 del gen diana (Notch1), así como un sitio loxP sólo en el intrón 1. Las células madre embrionarias correctamente electroporadas con esta construcción, se transfectaron con un vector Cre recombinasa para retirar el cassette seleccionado. Las células madre embrionarias resultantes, que llevaban el exón 1 flanqueado con sitios loxP, fueron inyectadas en blastocistos para generar las quimeras.

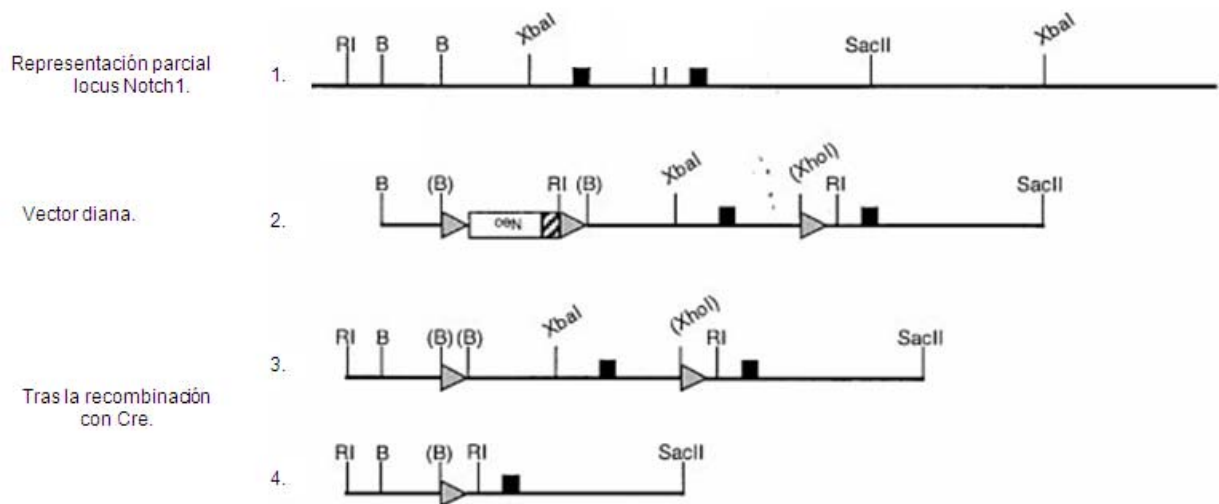


FIGURA 14. Locus Notch1. Los cuadros negros representan los exones codificantes. Mediante recombinação homóloga en el vector diana se introducen tres sitios loxP (triángulos). La acción de una Cre recombinasa produce la recombinação de los sitios loxP. Puede perderse sólo el cassette PGK-neo (3), o perderse el cassette más una porción de 3,5 kb del gen Notch1 lo que provoca la delección de parte del promotor Notch1 (4).

1.4. Línea R26R-EYFP:

Estos animales fueron cedidos por el Dr. Joachim Goethert desde el Departamento Universitario de Hematología del Hospital de Essen, Alemania, y generados en el laboratorio del Dr Costantini (Srinivas, Watanabe et al. 2001). Llevan insertado en el locus Rosa26, una secuencia STOP de lectura flanqueada por sitios LoxP que previene la lectura del gen reportero EYFP (del inglés *Enhancer Yellow Fluorescent*

Protein), situada en posición 3'. Expresan la proteína fluorescente YFP en todos sus tejidos cuando son cruzados con ratones que expresan la recombinasa Cre.

1.5. Línea SCL-Cre-ER^T:

Línea generada por el Dr. Joachim Goethert desde el Departamento Universitario de Hematología del Hospital de Essen, Alemania (Goethert, Gustin et al. 2005). La construcción genética empleada para generar estos ratones es: p6E5/Cre-ER^T/3'Enh. Para generar el plásmido p6E5/Cre-ER^T/3'Enh, un fragmento de 2.1 kb de cDNA Cre-ER^T fue clonado por debajo de la secuencia promotora 6E5 (fragmento 2.4-kb *Sau3AI/NdeI*), y por encima del SCL-3'Enhancer (fragmento 5.5-kb *BglII/BglII*). El fragmento de inyección, liberado mediante digestión con *NheI/SalI*, fue purificado y empleado para inyección en pronúcleo de oocitos fertilizados C57BL/6xC57BL/6.

1.6. Línea Act-DsRed (CAG-DsRed*MST-1Nagy/J):

Procedentes de Laboratorios Jackson (referencia 005441), y cedidos por el Dr. M. Dolado. Fonde genético C57BL/6N. Estos ratones expresan la proteína fluorescente roja (variante DsRed.MST), bajo el promotor ubicuo de la β actina de pollo unido al enhancer del citomegalovirus, con una longitud de onda, que penetra en los tejidos de una forma superior a otras variantes espectrales con menor longitud de onda (por ejemplo GFP (Vintersten, Monetti et al. 2004). Se realizaron al menos 11 retrocruces con los híbridos B6/CBA antes de utilizarlos en ensayos de trasplante.

1.7. Línea Silvestre:

Esta línea está constituida por híbridos B6CBA procedentes del cruce de machos CBA con hembras C57BL/6NHsd adquiridos en HarlanTM.

2. TIPAJE DE RATONES TRANSGÉNICOS MEDIANTE PCR DE DNA GENÓMICO.

La determinación del genotipo de los ratones se realiza mediante PCR de gDNA. El protocolo de extracción del gDNA varía según el tejido a partir del cual se realice: muestra de oreja si es para tipaje rutinario de ratones transgénicos; muestra de sangre para determinación del quimerismo hematopoyético en trasplantes; otros tejidos, como saco vitelino, para tipaje de embriones. A continuación, se detallan los diferentes protocolos de extracción de gDNA.

2.1. Extracción de gDNA a Partir de Muestras de Sangre.

Para la obtención de sangre periférica, se induce vasodilatación mediante la exposición de los animales a una lámpara térmica de 250W durante 10 minutos. A continuación, se frota con etanol la zona de la cola y se realiza una pequeña incisión en la vena lateral. Se recogen entre 7-10 gotas de sangre en un eppendorf con 500 µl de buffer de extracción (0.05 M TRIS pH 8, 0,1 M EDTA, 0.1 M NaCl, 1% SDS en agua milliQ estéril). Seguidamente, se añaden 10µl de proteinasa kinasa (pK) (20mg/ml, P-6556, Sigma- Aldrich), se mezcla e incuba en el termo-bloque a 56°C toda la noche para proceder posteriormente a la extracción de gDNA con fenol cloroformo. Se realizan dos pasos de extracción con fenol/cloroformo (Phenol Solution, p4557-400ml, Sigma-Aldrich; Cloroformo, 1.02445.1000, Merck), para ello, se añaden 500ul de fenol/cloroformo a los eppendorf, se agitan y se centrifugan a 13.000 rpm durante 15 minutos. Se recoge, 400 ul de sobrenadante y se añade 350ul de Isopropanol (20842.298, Prolabo), mezclando por inversión para hacer precipitar el DNA. Después de centrifugar se retira el sobrenadante y se añaden 1ml de etanol al 70%. Se centrifuga y se retira el sobrenadante en su totalidad. El pellet se resuspende en 50µl de TE (Tris EDTA, 10 mM de Tris-CIH pH 8 y 1 mM de EDTA pH 8.0 en agua destilada estéril, ver Apéndice).

2.2. Extracción de gDNA a Partir de Tejidos y Suspensión Celular.

Para la obtención de DNA genómico a partir de tejidos, se utiliza cloruro sódico 5M. Se obtienen muestras de 1-3mm de tejido homogenizado mecánicamente o pellet de $1-5 \times 10^6$ células y se realiza la digestión con 5 μ l de proteinasa K en 750 μ l de buffer de extracción (ver Apéndice) toda la noche. A continuación, se añaden 250 μ l de CINA 5M, se agitan unos 10 minutos, y se centrifugan a 13.000 rpm durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se transfieren 750 μ l a otro eppendorf, y se añaden 500 μ l de Isopropanol (20842.298, Prolabo), mezclándose por inversión para hacer precipitar el DNA. Se vuelve a centrifugar, y se retira el sobrenadante para lavar el pellet con etanol al 70%. Se centrifuga y se retira el sobrenadante en su totalidad. El pellet se resuspende en 50 μ l de TE, de donde se recogerán 2 μ l para cada reacción de PCR que se realice.

2.3. Tipaje de Animales Transgénicos mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Las reacciones de PCR para cada marcador se realizan en un volumen final de 25 μ l, y las condiciones de tiempo y temperatura estandarizadas para todas las PCR de gDNA se indican en Tabla 1. Un ejemplo tipo de la concentración de cada reactivo se indica en Tabla2, estas concentraciones varían dependiendo de cada tipo de amplicón. La lista de oligonucleótidos empleados para cada línea se indica en la Tabla 3. Los equipos de PCR empleados fueron dos: VWRI 732-1210 y Biometra.

Tabla 1. Programa de PCR empleado.

Paso	Tiempo	Temperatura	
1: Desnaturalización	5 minutos	95°C	
2: Desnaturalización	10 segundos	95°C	X 34
3: Unión de cebadores	30 segundos	65°C	
4: Amplificación	60 segundos	65°C	
5	10 minutos	72°C	
6	∞	4°C	

Tabla 2. Reactivos empleados en la reacción de PCR. Ejemplo de concentraciones para tipaje.

Mezcla de reacción. +	Volumen (μl)
Agua miliQ	15.3
Buffer 10x	2.5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTP's (5mM)	1
Oligonucleótido 1 (10 μm)	2
Oligonucleótido 2 (10 μm)	2
Taq polimerasa (5U/μl)	0.2

Tabla 3: Lista de oligonucleótidos empleados para tipaje.

Cepa de ratón	Denominación	Secuencia	Tamaño
SCL3'Énh-PLAP , L1791	PLAP		
	PLAP f (pAp3f)	GACTGAGCCCATGACACCAA	375 pb
	PLAPr (pAp3r)	TGGACAAACCACAACCTAGAAGC	
Act-DsRed	RFP		
	Rfp1	CCCCGTAATGCAGAAGAAGA	208 pb
	Rfp2	GGTGATGTCCAGCTTGGAGT	
Todos los ratones	Miogenina (Myo)		
	M1	TTACGTCCATCGTGGACAGC	300 pb
	M2	TGGGCTGGGTGTTAGTCTTA	
SCL3'Énh-NIC L318 y L197	NCS (transgen)		
	E5	TGGGTTGCTTTGGGGAACCGATG	280 pb
	Nas	ACCATCTGAGGCATTCTTCAGG	
Noch1lox	N1lox.		
	Loxf	TGCCCTTTCCTTAAAAGTGG	281 pb mutante.
	Loxr	GCC TACTCCGACACCCAATA	231pb Silvestre.
SCL3'Énh-CreER™	SCLCre.		
	Cre f	TCGATGCAACGAGTGATGAG	500 pb
	Cre r	TTCGGCTATACGTAACAGGG	
R26R-EYFP	Rosa EYFP.		
	Rosa 161	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	300 pb mutante.
	Rosa 162	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC	550 pb Silvestre.
	Rosa 163	GGAGCGGGAGAAATGGATATG	
SCL-Cre;Notchlox tratados tamoxifeno	Delete		
	D1	GGCCATTGAAAGCACACTATGG	300 pb mutante.
	D2	ACACCCAATACCTGTTTCGCAG	

Las muestras se corren en gel de agarosa (A-5093 Sigma) al 1% preparado a partir de una solución de TBE 0,5x (Tris Borato EDTA: Tris-borato 45mM, EDTA 1mM, ver Apéndice) y las bandas se tiñen con bromuro de etidio y se detectan con lámpara ultravioleta.

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRÁNSCRIPTOS.

3.1. Aislamiento de RNA.

Para obtener el RNA se prepara el pellet de una suspensión celular de 1- 5 millones de células de tejido fresco, se resuspende en 1 ml Trisure (BIO 38032 Bioline) y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añaden 200 µl de cloroformo (ref.1.02445.1000 Merck), se agita 15 segundos, se incuba 3 minutos y se centrifuga a 12000g durante 15 minutos a 4°C. Seguidamente se toman 600 µl de la fase superior y se mezclan con 500 µl de Isopropanol por inversión. Después de incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente se centrifuga a 12000g 10 minutos a 4°C y se añade 1 ml de etanol 75% frío al pellet. Se centrifuga de nuevo a 7.500g 5 minutos a 4°C y se deja a -20°C durante al menos una hora para su precipitación. Después de centrifugar se deja secar 5 minutos al aire. Resuspender en 25 µl de agua miliQ.

3.2. Obtención de cDNA.

Para realizar la retrotranscripción, se mezclan los siguientes reactivos:

- | | |
|---------------------|--|
| -Muestra de RNA | volumen necesario para 2 µg de RNA. |
| -Agua miliQ | volumen necesario para llegar a 20 µl. |
| -Buffer 10x | 2 µl. |
| -Inhibidor de RNAsa | 1 µl. |

La mezcla se incuba a 37°C durante 1 hora, se centrifuga 10 segundos a 10.000 rpm y se añaden 2 µl de DNAsa I (Invitrogen). Después de incubar 15 minutos a temperatura ambiente se inactiva la DNAsa mediante un choque térmico de 65°C durante 5 minutos. A continuación se añaden 20 µl de cloroformo se agita 30 segundos y después de centrifugar a 5.000rpm 5 minutos se toma del SN y se añaden

2 µl de AcNa 3M pH 5,2 mezclando bien. De nuevo se añden 40 µl de etanol 100% frío y se precipita a -20°C durante una hora. Centrifugar las muestras a 13.000rpm a 4°C, durante 15 minutos. Retirar todo el sobrenadante y añadir 1 ml de etanol 75% frío. Centrifugar las muestras a 13.000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Retirar todo el etanol y dejar secar en un termobloque a 50°C, hasta que desaparezca todo el etanol. Se prepara el oligo DT como sigue: Agua miliQ 47µl, Oligo DT 1 µl y RNAsa out 2 µl.

Mezclar muy bien y calentar a 65°C 5 minutos. Dividir cada tubo en dos. A uno se le echará el mix+ y al otro el mix-, este último será el control para comprobar que no hay gDNA.

- Mix+:
- RT buffer 10 µl.
- 0,1 M DTT 2,5 µl.
- Suero fetal bovino 0,5 µl.
- dNTP 10m mM 5 µl.
- Agua destilada 6 µl.
- MMLV 2 µl.
- Mix-:
- RT buffer 10 µl.
- 0,1 M DTT 2,5 µl.
- Suero fetal bovino 0,5 µl.
- dNTP 10m mM 5 µl.
- Agua destilada 8 µl

La reacción se incuba a 42°C durante 90 minutos, 65°C 5 minutos y 4°C una hora. Todos los reactivos utilizados son de Invitrogen.

3.3 Cuantificación Semicuantitativa de Transcritos.

La amplificación de transcritos para Notch1, GATA2 y Hes1 se realiza por PCR empleando oligonucleótidos previamente publicados (Robert-Moreno, Espinosa et al. 2005). Se emplean oligonucleótidos de actina como control. Para la valoración de la cantidad de transcritos, se realizan PCR a 30, 35 y 40 ciclos, se corren en gel de agarosa y se determina la intensidad de banda. Se toma el ratio Actina/banda control a 40 ciclos como valor estimativo.

4. OBTENCIÓN Y TINCIÓN DE EMBRIONES.

Para la obtención de embriones a diferentes estadios de gestación, se establecen cruces y se revisa diariamente la aparición del tapón vaginal, designado como día cero de gestación (E0).

4.4. Tinción de LacZ para Embriones:

El X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), es un sustrato cromogénico para la β galactosidasa que forma un precipitado de color azul. Se emplea como indicador de aquellas células que expresan la enzima β -galactosidasa, codificada por el gen lacZ. Para determinar los embriones que son transgénicos SCL-LacZ, se fija el tejido a analizar (saco vitelino o embrión), en 4% paraformaldehído, 0.25% glutaraldehído durante 30 minutos. Debe estar en hielo y agitándose. Lavar tres veces con solución de lavado, cinco minutos cada vez y en agitación. Incubar a 37°C en solución de tinción. Se debe revisar cada 10 minutos, si aparece coloración azul es positivo para LacZ. En unos 30 minutos la tinción se completa (para los reactivos ver Apéndice).

4.5. Tinción de Fosfatasa Alcalina para Embriones:

Para poder seleccionar sólo los embriones transgénicos generados en cruces entre ratones de la línea 1791 (SCL3'Enh-PLAP), se detecta la expresión de PLAP mediante una reacción enzimática coloreada con el sustrato de la fosfatasa alcalina BCIP/NBT. Se toman partes del embrión que no van a ser utilizadas, como el saco vitelino o la cabeza, en 0,5 ml de PBS1X (0780, Amresco), y se incuban durante 30 minutos a 75°C para inactivar la fosfatasa endógena. Después de enfriar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se retira el PBS y se añaden 0,5 ml de solución de lavado fosfatasa alcalina (0.1 M Tris-HCl a pH 9.5, 0.01 M MgCl₂, 0.1 M NaCl en agua milliQ, ver Apéndice). Se agitan e incuban 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, hay que retirar la solución de lavado para añadir la solución de tinción fosfatasa alcalina (0.1 M Tris-HCl a pH 9.5, 0.05 M MgCl₂, 0.1 M NaCl, y 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium -BCIP/NBT- ref. 1681451, Roche, en agua milliQ, ver Apéndice). Se incuban 5 minutos, y aquellos embriones que sean SCL-

3'EnhPLAP positivos adquirirán un color morado, mientras que los silvestres quedarán sin teñir. Se seleccionan sólo los órganos hematopoyéticos de los transgénicos, pudiendo usar los silvestres como controles.

5. OBTENCIÓN DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS.

5.1. Obtención de Células Hematopoyéticas de Recién Nacido y de Adulto.

Las células de sangre se obtienen mediante punción en la cola de animales vivos donde se induce vasodilatación por temperatura (5 gotas de sangre) o por punción cardiaca en animales sometidos a anestesia teminal . En este caso se recogen en 2ml de PBS/EDTA para análisis por FACS o en buffer de extracción de gDNA (ver Apéndice). Para el análisis por FACS las células se tratan con bufer de lisado para eritrocitos. Entre 7-10 gotas de sangre se recogen en tubos de citometría conteniendo 2 ml de PBS/EDTA (80 ml PBS + 1,6 ml EDTA 0,5M, ver Apéndice) en hielo. Seguidamente, se centrifuga a 1100rpm durante 5 minutos a 4°C, se aspira el sobrenadante, y los tubos se transfieren a un baño a 37°C. Las células se resuspenden en 2ml de solución de lisis de eritrocitos precalentada (0,14M NH₄Cl y 0,017M Tris, pH 7,2, ver Apéndice), y se incuba durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se centrifuga y, si el pellet es rojo, se repite la lisis hasta que sea blanco. Lavar las muestras con 3ml de PBS al 5% de FCS, y proceder a la tinción con anticuerpos anti-PLAP y CD45 para análisis por FACS. La señal DsRed se determina directamente sin emplear anticuerpos

Para la obtención de células de tejidos de animal neonatos (2-4 semanas) y adultos (3-10 meses), los animales se sacrifican mediante decapitación (<10 días) o por dislocación cervical. Se limpia la zona del abdomen y patas traseras con etanol 70%, y se realiza una incisión y corte de la pared abdominal exponiendo los órganos. Para el aislamiento de células de médula ósea, se extraen la tibia y el fémur de ambas patas. Se elimina el músculo que rodea el hueso y se cortan las terminaciones de ambos huesos dejando expuesta la cavidad ósea a través de la cual, se pasa a presión 1 ml de D-PBS 5%FCS tres veces con una jeringuilla 27G, recogiendo el volumen en una placa Petri. En el caso de neonatos se emplea una lupa o se homogeneiza todo el hueso y se pasa posteriormente por una maya.

Las células del bazo y timo se obtienen por homogeneización mecánica de tejidos en D-PBS 5% FCS empleando una jeringuilla.

5.2. Obtención de Células Hematopoyéticas de Embriones.

En este trabajo se emplean células hematopoyéticas de hígado fetal E12 y E14. Los embriones son diseccionados bajo la lupa en placas petri con D-PBS frío con calcio y magnesio (D 8662 Sigma) y 5%FCS. El saco vitelino de cada embrión se transfiere a eppendorfs con D-PBS5%FCS para análisis complementarios, o para determinar el genotipo por PCR. El hígado fetal se transfiere a eppendorfs con 500 μ l de D-PBS 5%FCS, y se homogeniza mediante pipeteo suave (unas 20-30 veces).

6. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

6.1. Análisis de Expresión de Marcadores de Superficie y Separación Celular mediante Citometría de Flujo.

Entre 1×10^6 - 10×10^6 de células se resuspenden en 100 μ l de solución bloqueante (PBS 5% FCS, y 10% de sobrenadante que contiene bloqueante de receptores de inmoglobulinas, sobrenadante del cultivo del hibridoma 2.4G2 con anticuerpo contra el receptor de inmunoglobulinas Fc γ III/II Receptor, rat anti mouse CD16/CD32), y se incuban 30 minutos en hielo. Seguidamente, se añaden los anticuerpos primarios (Anexo I), se incuban 30 minutos en hielo y se lavan en PBS 5%FCS dos veces. La incubación con anticuerpos secundarios (Anexo I) se realiza de la misma manera. Después de los lavados, se resuspenden las muestras en PBS 5%FCS, y se determina la intensidad de fluorescencia con el citómetro de flujo FACS Aria Cell Sorter (B&D), equipado con láseres azul de 488nm y rojo de 633nm y el software FACSDiva. Para detectar células muertas se emplea el reactivo 7AAD a 1ng/ml (7-Aminoactinomycin-D, A9400, Sigma-Aldrich). Este se añade a la muestra en el último paso de la tinción con anticuerpos. Se incuban 30 minutos y se lava.

Para la separación de poblaciones celulares por citometría de flujo, se resuspenden las células en 2 ml de DPBS 5%FCS1%P/E (penicilina/estreptomicina) y se separan en base a viabilidad (7AAD neg.) y la expresión del correspondiente marcador. Las diferentes poblaciones celulares se recogen en D-PBS con Ca^{2+} y Mg^{2+} al 50% FCS 1%P/E. Posteriormente, se centrifugan a 1500rpm durante 5 minutos, se cuentan y resuspenden en D-PBS1%FCS para ser trasplantadas, o para su posterior análisis in vitro. La pureza de las poblaciones seleccionadas se encuentra entre el 90% y el 98%. En el caso de la médula ósea, se separan las poblaciones c-kit positiva (progenitores), de la población linaje positiva (determinada mediante los anticuerpos B220, Mac1, CD4, CD8 y Ter119). Para la separación de células estromales se realiza una tinción de cuatro colores incluyendo el marcador 7AAD y los anticuerpos, CD45 y la mezcla empleada para de linaje. Para el hígado fetal, se emplean c-kit y Ter119 para aislar la población de progenitores (c-kit positiva). Así, se obtienen poblaciones enriquecidas en células madre hematopoyéticas lin- c-kit+ de médula ósea y de hígado fetal.

6.2. Análisis de la Expresión de NIC-FLAG Intracitoplásmico Mediante FACS.

Para determinar la expresión de la proteína NIC-FLAG en las células progenitora c-kit+, se determina por anticuerpos específicos y análisis por citometria de flujo la expresión intracitoplasmica de FLAG. Para ello, se incuban las células con el anticuerpo primario ckitPE y despues de lavar se añade paraformaldehido al 4%, (100 μl pp/1.10⁶ células a cada tubo). Se incuban a temperatura ambiente durante 20 minutos y después de lavar 2x en PBS se elimina bien el sobrenadante y se añade 100 μl /1.10⁶ células de permeabilizante (PBS 0,1% saponina). Se mezclan con cuidado las células con el permeabilizante y se dejan incubando 15 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación se reparte el volumen en dos tubos y en uno se añade el anticuerpo MCA4764F de AbDserotec (dil 1/500). En el otro no se añade nada y sirve como control. Se incuba durante 1 hora y se lava con PBS 0,1% saponina dos veces. Se resuspende en 250 μl de PBS1x 0,05%formol se determina la intensidad de fluorescencia por el citómetro.

7. FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS MADRE: ENSAYOS DE REPOBLACIÓN A LARGO PLAZO.

7.1. Descripción del Modelo de Trasplante en Recién Nacidos.

Para la generación de quimeras hematopoyéticas y evaluación del potencial de repoblación de las células madre hematopoyéticas, se realizan trasplantes en receptores recién nacidos previamente tratados con el agente mieloablativo busulfán. Es un modelo de receptor “universal”, ya que en el injertan tanto CMH de tipo embrionario como adulto. Se basa en el método descrito por Yoder aunque con algunas modificaciones (Yoder, Cumming et al. 1996) y el protocolo ya fue publicado por nuestro grupo (Dekel, Metsuyanin et al. 2008). En resumen, los animales son tratados con busulfan que elimina gran parte de las células endógenas del recién nacido, esto permite el injerto y repoblación de las células transplantadas por vía intravenosa (iv). El pico de deplección inducida se produce a día 3-4 en bazo. A partir de día 5 las células endógenas se recuperan y los animales sobreviven si no son transplantados (datos no mostrados). Para obtener un buen injerto es importante realizar el trasplante en los primeros días después del nacimiento. El busulfán (B-2635, Sigma-Aldrich), se prepara a 1mg/ml, mezclando mediante agitación 12.5mg de busulfán en 250 µl DMSO (ref. 154938 Sigma). Una vez resuspendido, se añaden 12,5 ml de DPBS precalentado a 50°C y se mantiene a esta temperatura hasta su administración. Las hembras embarazadas se inyectan a día 17 y 18 de gestación intraperitonealmente con una dosis de busulfán de 15mg/kg. Los ratones receptores nacen a día 19, y las células donantes se transfieren al día siguiente en la vena facial de los recién nacidos en una suspensión de 50µl de D-PBS1%FCS según el protocolo descrito (Sands and Barker 1999) (Figura 15).

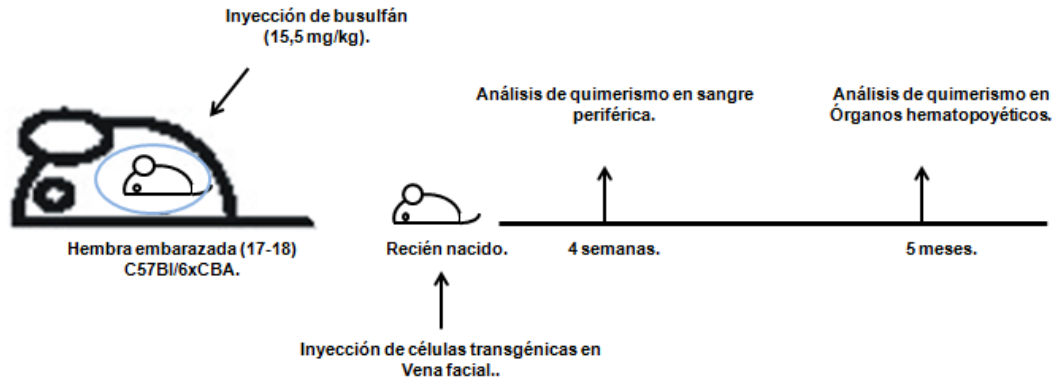


FIGURA 15. Esquema de generación de quimeras a partir de recién nacidos.

7.2. Ensayos de Repoblación.

7.2.1. Trasplante de poblaciones no fraccionadas.

Células de médula ósea de adulto (5×10^6 células por receptor), o de hígado fetal E12 o E14 (1×10^6 células por receptor), de las diferentes líneas transgénicas fueron trasplantadas por vía intravenosa a receptores recién nacidos. El seguimiento del quimerismo hematopoyético se realizó a las 4 semanas y a los 5 meses post-trasplante en muestras de sangre periférica. Los animales se consideran reconstituidos cuando presentan un porcentaje de células donantes $>1\%$ en sangre periférica por citometría o por PCR.

7.2.2. Trasplantes en dilución límite.

Este ensayo es una modificación del ensayo convencional en el cual los animales son transplantados con diluciones decrecientes de células (8-15 animales por dosis). El fin de este experimento es estimar la dosis mínima celular que permite la repoblación hematopoyética y así estimar el número de CMH funcionales. En este ensayo a las cuatro semanas post-trasplante, se determina el número de animales negativos que no presentan células donantes y se aplica el análisis estadístico de Poisson empleando el software L-Calcul de Stem Cell Technologies. En general, se estima que para que el ensayo sea válido se deben analizar al menos 8 ratones por dosis, y emplear un mínimo de 3 dosis. (Szilvassy 1990). En el caso de células de médula ósea adulta se

emplearon 1, 0,5 y 0,25 x 10⁶ de células por receptor, y de hígado fetal 1, 0,5 y 0,20 x 10⁶ células

7.2.3. Cotrasplantes de poblaciones lin-c-kit+.

El objetivo de este ensayo es comparar la capacidad y eficiencia de dos poblaciones de CMHs para reconstituir el sistema hematopoyético de los receptores tratados con busulfan. Se transplantan 10⁴ células lin-c-kit+ NIC y junto con 10⁴ células lin-c-kit+ silvestres (procedentes de transgénicos DsRed). Las células se obtienen de hígado fetal o médula ósea como ya se ha indicado.. En el caso del hígado fetal y la médula ósea de recién nacido, se combinan las células de varios donantes con idéntico genotipo. La frecuencia de animales repoblados, y el nivel de repoblación, se determinan en sangre periférica a las 4 semanas y 5 meses post-trasplante

7.2.4. Trasplantes secundarios.

Quimeras hematopoyéticas primarias (> 5 meses), trasplantadas con células de hígado fetal sin fraccionar, se sacrifican y se determina su nivel de quimerismo hematopoyético mediante PCR. Se seleccionan aquellas con mayor nivel de injerto hematopoyético en médula ósea y se transplantan 5x10⁶ células a nuevos receptores recién nacidos para generar quimeras secundarias. En los animales trasplantados se analiza la repoblación hematopoyética a corto y largo plazo. La médula ósea de estas quimeras secundarias se extrae y se emplea para analizar el nivel de expresión de los genes diana de Notch según se describa a continuación.

7.3. .Análisis de quimeras hematopoyéticas.

-A corto plazo (al mes del trasplante): El injerto hematopoyético a corto plazo se determina por detección en sangre periférica del marcador genético de las células donantes (PLAP, DsRed o NIC), mediante citometría de flujo y/o PCR. La obtención de células de sangre se ha detallado previamente.

-A largo plazo (a los 5 meses del trasplante): El injerto hematopoyético a largo plazo, se determina por cuantificación de células donantes (PLAP+ o DsRed+), por citometría de flujo en sangre periférica. También se determina por PCR semicuantitativa de

marcadores genéticos en sangre periférica, bazo, médula ósea, nódulos linfáticos y timo.

7.3.1 PCR semicuantitativa.

El DNA genómico se extrae a partir de $1-5 \times 10^6$ células procedentes de diferentes órganos (sangre, bazo, médula y timo).

La concentración de DNA obtenida, se mide en el espectrofotómetro Nanodrop, y se iguala a 40ng/μl en todas las muestras. Para generar la escalera de diferentes concentraciones del marcador, se realizan diluciones seriadas de DNA genómico obtenido de un ratón transgénico, con la suspensión de DNA genómico de un ratón no transgénico. Se realizan diluciones al 100%, 10%, 1%, 0.1% y 0% de DNA genómico del transgénico. Todas ellas a una concentración de 40ng/μl. El producto de PCR para los diferentes marcadores se corre en un gel de agarosa y tiñe con-bromuro de etidio. Para la cuantificación de las bandas en los geles, se emplea el software del Typhoon9410, o el software de análisis Gel-Pro Analyzer. Valores normalizados con respecto a la banda de miogenina se integran en la curva obtenida con la escalera de diluciones y, mediante comparación de intensidad de banda en el programa, se estima el porcentaje de contribución hematopoyética de cada órgano (Muller and Dzierzak 1993; Sanchez, Holmes et al. 1996; Silberstein, Sanchez et al. 2005).

8. ENSAYOS DE ANIDAMIENTO EN MÉDULA ÓSEA.

Se generan quimeras hematopoyéticas empleando 1×10^6 de células de médula ósea de ratón adulto. Se emplean células procedentes de ratones silvestres y de ratones transgénicos para SCL-NIC^{DsRed}. Sacrificar a los animales mediante decapitación (1 día de edad), o dislocación cervical (10 y 30 días de edad). Diseccionar los animales y obtener muestras de sangre, bazo y médula ósea de cada uno de ellos. Lisar los eritrocitos de la sangre (ver 6.2), y teñir las muestras con anticuerpo CD45 para citometria de flujo, el DsRed se detecta directamente sin necesidad de incubar con anticuerpos.

Obtener una suspensión celular a partir de la médula ósea de las quimeras, y lavar con PBS5%FCS. Teñir las muestras de médula ósea con los anticuerpos c-kit, B220, Mac1, CD4, CD8 y Ter119 para citometría de flujo. Analizar mediante citometría de flujo.

9. ANÁLISIS DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE GENES DEPENDIENTES DE NOTCH POR PCR A TIEMPO REAL.

Para poner a punto la PCR a tiempo real, se emplearon células de timo fetal de día 14 de desarrollo, ya que los linfocitos T inmaduros presentan activación de la ruta de Notch y, en general, altos niveles de Notch1 y Hes1 (Tomita, Hattori et al. 1999). Como gen endógeno de referencia se empleó Gapdh (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). El proceso de puesta a punto del QPCR tiene tres pasos: 1-Diseño de oligos y test de especificidad de oligos en muestras de timo. 2-Puesta a punto de obtención de mRNA con bajo número de células. 3-Q-PCR en muestras de células sorteadas.

9.1. Diseño de los Oligonucleótidos Empleados y Test de Especificidad en Muestras de Timo.

Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de DNA a tiempo real fueron diseñados con ayuda de Primerblast, excepto en el caso de Hes1, que se obtuvo del artículo de Kobayashi et al 2009. Se introdujo la secuencia del gen de interés en la página web y se solicitó el diseño de los oligonucleótidos. De entre todos los pares obtenidos, se seleccionaron aquellos que daban como resultado fragmentos de DNA inferiores a las 200 pb. Se emplearon siempre a concentración de 10 μ M y son los siguientes:

Tabla 4. Oligonucleótidos para PCR a tiempo real.

Denominación	Secuencia	Tamaño
Notch1		
Notch1.1:	AAGGATTGGAGTCCTGGCAT	132 pb
Notch1.2:	CAAGAGGCTTGAGATGCTCC	
Gata2:		
Gata 2.1	GCCATAAGGTGGTGGTTGTC	145 pb
Gata 2.2	CACTACCTGTGCAATGCCTG	
Hes1		
Hes1f	TGAAGGATTCCAAAAATAAAATTCTCTGGG	198 pb
Hes1 r	CGCCTCTTCTCCATGATAGGCTTTGATGAC	
GAPDH		
GAPDH 1:	TGCACCACCAACTGCTTAG	177 pb
GAPDH 2	GGATGCAGGGATGATGTTC	

Para la reacción de QPCR se empleó el kit de SYBR Green de Culteck siguiendo el siguiente protocolo: Se añaden 2ul de cDNA (duplicados) por pocillo en placas de PCR (ref.1010375, Illumina). Se prepara el mix con las siguientes cantidades: 2.5 ul de Agua destilada estéril; 5 ul de Kappa SYBR mixRef KK4601; 0.2 ul de óligo 1 10uM; 0.2 ul de óligo 2 10uM. A continuación se añaden 8 ul de mix por pocillo. La placa se coloca en el termociclador eco Illumina de Cultek y se selecciona la opción de cuantificación relativa con el siguiente perfil térmico: 50°C 2 minutos, activación de la polimerasa: 95°C 3 minutos, ciclos (40): 95°C 3 segundos, 60°C 20 segundos; 95°C 15 segundos, 55°C 15 segundos, 95°C 15 segundos. La Ct para cada reacción se establece en el punto de inflexión de la curva amplificada cuando se representa el número de ciclos frente a la fluorescencia. Para el análisis de los datos se emplea el método del Ct comparativo. Se normaliza la cantidad o Ct del gen target o gen de referencia (DCt). Se comparan los DCt de cada muestra con el de la muestra de referencia: DDcT. La cantidad relativa en cada muestra viene dada por la fórmula $2^{-(DCt-DDcT)}$. Una vez finalizados los ciclos, se comprobó su especificidad determinando las

curvas de fusión y corriendo las muestras en geles de agarosa (figura 16). También se determinó el ciclo umbral (Ct), ciclo para el cual se comienza a detectar amplificación. En general, el valor Ct se encuentra alrededor de los ciclos 30 y 40 (excepto para Gapdh, que es 22-25), lo que indica cantidades moderadas de transcritos.

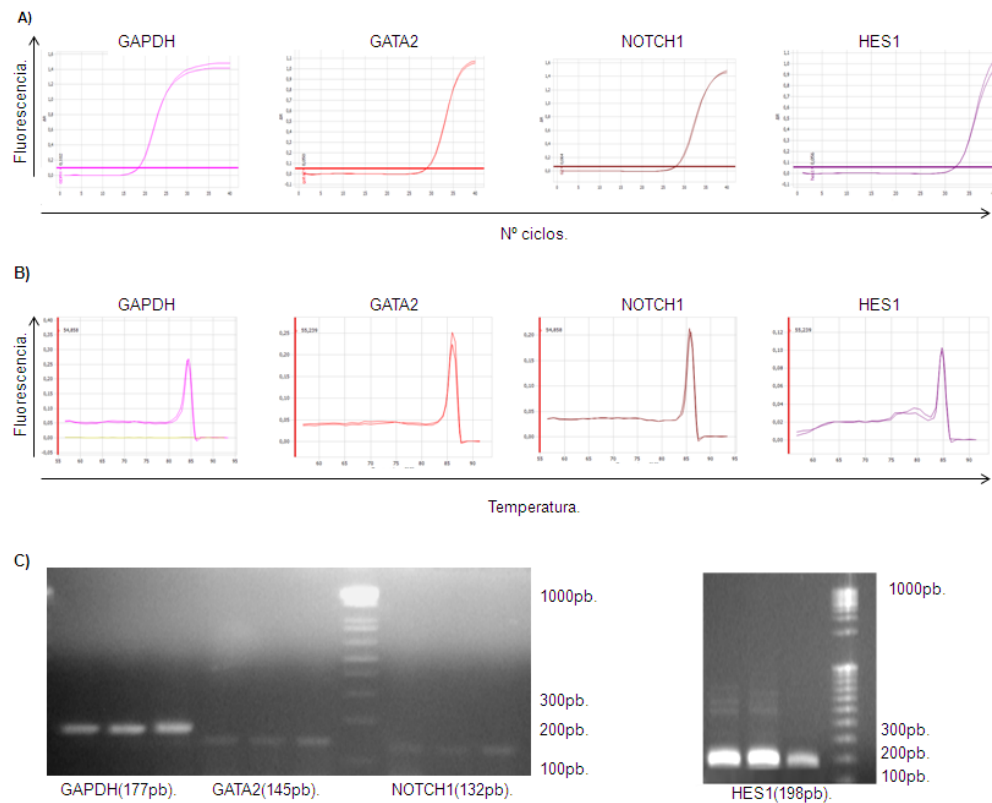


FIGURA 16. PCR a tiempo real para cuantificación relativa de genes diana de Notch en muestras control de timo fetal E14. **A)** Curvas de amplificación y establecimiento del Ct (ciclo umbral). Se representa la intensidad de fluorescencia respecto al número de ciclos. **B)** Determinación de la especificidad del producto de PCR. Curvas de fusión para Gapdh, GATA2, Notch1 y Hes1. Todos los oligonucleótidos amplifican en torno a los 85°C mostrando un pico único. **C)** RT-PCR de Gapdh, GATA2, Notch1 y Hes1 corridas en geles de agarosa junto a un marcador de peso molecular. Se observa una banda única en todos los casos.

9.2. Aislamiento de RNA a Partir de Células Sorteadas.

Recoger en torno a 10.000-15.000 células, y retirar todo el líquido que puedan contener mediante centrifugación. Añadir 1 ml de Easy blue (Intron Biotechnology ref 17061), y agitar 10 segundos. Añadir 200 µl de Cloroformo, agitar 10 segundos y centrifugar 10 minutos a 13.000rpm. Transferir 400 µl de la parte superior a un tubo limpio. Añadir 400 µl de Isopropanol (ref), y mezclar por inversión 2-3 veces. Dejar 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm. Retirar el líquido para obtener el pellet de RNA y añadir 1 ml de etanol 75% frío. Mezclar por inversión. Centrifugar 5 minutos a 10.000rpm. Descartar el sobrenadante y secar el pellet de RNA (5 minutos a temperatura ambiente). Disolver el RNA en 30 µl de agua destilada estéril tratada con DEPC.

9.3. Síntesis de cDNA.

Para la obtención de cDNA se emplean entre 10 pg y 1 µg de RNA. Se utiliza el kit Qiagen Quantitect Reverse Transcription Kit (ref.205311), y se sintetiza el cDNA siguiendo las instrucciones del kit.

9.4. Cuantificación Relativa.

Como se indica anteriormente, se emplea como método de cuantificación la cuantificación relativa mediante el software del equipo eco Illumina de Cultek y el mix Kappa SYBR, que nos permite medir el nivel de expresión de un gen en una muestra en relación con el nivel de expresión en una muestra de referencia. En nuestro caso, tomamos siempre como referencia la expresión de los genes en estudio en células procedentes de ratones silvestres y comparamos la expresión de los mismos genes en células procedentes de ratones transgénicos SCL-NIC. Además, los niveles de expresión de cada gen en los ensayos son normalizados empleando como referencia el gen Gapdh.

10. DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS RATONES NOTCH1 LOXP.

10.1. Preparación del Tamoxifeno.

El tamoxifeno es un antagonista del receptor de estrógeno, que es transformado en el hígado en su metabolito activo, el hidroxitamoxifeno. Al inyectar tamoxifeno en las hembras preñadas de los trasgénicos que contienen la proteína de fusión de la recombinasa Cre con el receptor de estrógeno modificado respondedor al Tx (Cre-ERTM), la proteína Cre se transloca al núcleo y ejerce su acción de recombinasa en los sitios loxP. Esto permite controlar la expresión/no expresión de diferentes genes de forma condicional.

El tamoxifeno (Sigma T5648) se disuelve en aceite de maíz (Sigma C8267) a una concentración final de 10mg/ml. El aceite se añade a 42° C y se baja a 37°C dejando en agitación toda la noche para que se disuelva. Alicuotar y conservar a -20°C. Se inyecta vía intraperitoneal.

10.2. Tratamiento y Determinación de la Dosis de Tamoxifeno.

El tamoxifeno se inyecta vía intraperitoneal a las hembras gestantes en diferentes estadios del desarrollo de los embriones. Los test se realizan empleando cruces de ratones de las líneas SCL-Cre-ER^T y R26R-EYFP. Tras inyectar el tamoxifeno a las hembras gestantes procedentes de estos cruces, se analizan los embriones a día 12 o día 14 de desarrollo y se determina el porcentaje de YFP que expresan a nivel del hígado fetal mediante citometría de flujo. Los distintos protocolos de inyección utilizados se muestran en el apartado de resultados.

10.3. Análisis de Células de Hígado Fetal Derivadas de Mutantes Condicionales para Notch1.

Para analizar el efecto de la delección de Notch1 en células madre de hígado fetal, se establecen cruces “mutantes” SCL-Cre-ER^T; R26R-EYFP^{ff};Notch1loxP^{ff} y cruces “silvestres” SCL-Cre-ER^T; R26R-EYFP^{ff} ;Notch1loxP^{+/+} para conseguir embriones que

tengan animales homocigotos para Notch1loxP y silvestres que servirán ambos como controles. El Tx se administra a día 10 y 11 y el hígado fetal se analiza a día 14 de gestación mediante citometría y PCR.

11. PROTOCOLOS DE CULTIVOS.

11.1. Ensayo CFU-C Células de Hígado Fetal.

Se obtienen las células de hígado fetal E14 de los ratones SCL-Cre-ER^T; R26R;Notch1loxP; tras haber inyectado a las hembras gestantes con 2 mg de tamoxifeno los días 10 y 11 de gestación. Los ensayos de CFU-C se realizan con células sorteadas YFP+ y YFP-, y ckit+YFP+ y c-kit+YFP-. Se resuspenden en D-PBS 10% y se siembran 10³ células por pocillo en Methocult (ref M3434 Stem Cell Technologies). Siete días después, se cuenta el número de colonias generadas por cada tipo celular.

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se emplea el análisis t-Student para determinar el grado de significancia estadística. Valores “p” menores de 0,05 fueron considerados significativos.

También se empleó análisis de Poisson para el establecimiento de las unidades de repoblación competitivas realizándose el análisis de datos mediante el software informático L-Calcul de stem cell.

ANEXO.

ANEXO

Anticuerpos Primarios para citometria de flujo:

Anticuerpo.	Casa comercial.	Referencia.	Dilución de uso .
PLAP "rabbit α human alkaline phosphatase	Abdserotec.	AHP 537.	1/250.
CD45-PE anti ratón clon 30-F11	Biolegend	103106	1/100
CD4-FITC anti ratón clon RM4-4	eBioscience.	11-0043-82	1/100
CD4PE anti ratón clon GK 1.5	eBioscience	12-0041-82	1/100
CD-8-PE anti ratón clon 53-6.7.	eBioscience	12-0081-82	1/100
CD117 (ckit 2B8) fitc anti ratón.	B&D	553354	1/100
B220 FITC anti ratón CD45R clon RA3-6b2	eBioscience.	11-0452-82	1/100
Anti ratón CD45R b220 PE CLON RA3-6b2	eBioscience.	12-0452-82	1/100
Mac1antiratón CD11b FITC (M1/70)	B&D	553310	1/100
Anti ratón CD11b PE (M1/70)	B&D	553311	1/100
Ter119 anti ratón clon Ter119	eBioscience.	12-5921-82	1/100
Monoclonal ANTI-FLAG® M2-FITC	Sigma-Aldrich.	F4049	1/250
Rata anti ratón CD45	B&D	553076.	1/100

Anticuerpos secundarios:

Anticuerpo.	Casa comercial.	Referencia.	Dilución de uso .
Alexa fluor®goat anticonejo 488	invitrogen	A11034	1/500
Alexa fluor®647 anticonejo IgG	invitrogen	A21245	1/500
Alexa fluor®488 antiratón	invitrogen.	A11029	1/500
Alexa fluor®568 antirata	invitrogen.	A11077	1/500
Alexa fluor®647 antirata	invitrogen.	A21247	1/500
Alexa fluor®488 antirata	invitrogen.	A11006	1/500
Alexa fluor®goat anticonejo 568	invitrogen	A11036	1/500

Reactivos:

Reactivo.	Casa comercial.	Referencia.	Dilución de uso .
7-aminoactinomicina D 7AAD	invitrogen	775235	1/1000
Ioduro de propidio			
Estreptavidina Cy™5	GE Healthcare.	PA45001	1/500
Isolectina B4 (de <i>Bandeiraea simplicifolia</i>)	Sigma	L2140	1/50

RESULTADOS.

CAPITULO 1. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE NOTCH1 EN CÉLULAS MADRE Y PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DURANTE EL DESARROLLO.

1. ANÁLISIS DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS SCL-NIC.

1.1. Análisis de la Expresión de NIC bajo el Control del Vector SCL-3'Enh en Medula Ósea.

Para determinar el efecto de la activación de Notch1 en células madre y progenitores hematopoyéticos, se emplearon ratones transgénicos para el vector de expresión SCL-3'Enh-NIC (SCL-NIC). Este vector incluye el 3'enhancer derivado del factor de transcripción SCL (stem cell leukaemia gen), activo en células madre, progenitores hematopoyéticos y células del nicho medular (megacariocitos, células endoteliales vasculares y osteoblastos (Sanchez, Gottgens et al. 1999; Sanchez, Bockamp et al. 2001; Pimanda, Silberstein et al. 2006). Así mismo, incluye la forma activa intracitoplásmica del gen Notch1 (NIC, aa 1750-2293), unida al marcador Flag. Esta forma de NIC presenta delección de la zona PEST y parte del dominio de activación, como muestra el esquema de materiales y métodos (Figura 13) (Robey, Chang et al. 1996), y se eligió por su atenuado efecto pro-leucémico comparado con la forma intracitoplásmica completa (aa 1755-2555), la cual produce leucemias fulminantes de rápido desarrollo (Fowlkes and Robey 2002), y muerte temprana de los embriones transgénicos cuando se expresa bajo la regulación del vector Tie2 (Venkatesh, Park et al. 2008), impidiendo el estudio del efecto en hematopoyesis definitiva. Esta forma NIC atenuada sigue manteniendo su capacidad de activación e inducción de genes diana en líneas celulares, a pesar de no ser la forma completa intracitoplásmica (Aster, Xu et al. 2000).

Los ratones transgénicos para SCL-NIC son viables y nacen con una distribución mendeliana normal. En este estudio se han analizado simultáneamente dos líneas transgénicas SCL-NIC, denominadas L197 y L318.

Para determinar la expresión de SCL-NIC en células progenitoras hematopoyéticas, se realizaron estudios de expresión de RNA y proteína, empleando RT-PCR y citometría de flujo para detección de FLAG en células de médula ósea. Se determinó la

presencia de transcritos para NIC en células de médula ósea sin fraccionar, así como en poblaciones de progenitores hematopoyéticos lin-c-Kit⁺ y células maduras lin⁺c-Kit⁻ seleccionadas por citometría de flujo (los marcadores de linaje son B220, CD11b, CD4 y CD8). Así mismo, comparando los productos amplificados con oligonucleótidos para el gen endógeno Notch1 y para NIC, se determinó que estos últimos son específicos para el transgen y no amplifican el gen endógeno Notch1 (Figura 17 A). Los resultados mostraron que solamente se detectan transcritos NIC en la población lin-c-Kit⁺ enriquecida para células madre y progenitores hematopoyéticos, demostrando la especificidad de expresión a nivel de RNA del vector SCL-NIC.

Para confirmar la expresión de transcritos NIC por RT-PCR en las células del nicho de médula ósea, se obtuvo el cDNA de células endoteliales (lin-CD31⁺CD45⁻) y células estromales (lin-CD31⁻CD45⁻), empleando como control células hematopoyéticas diferenciadas (lin⁺CD45⁺), y progenitores hematopoyéticos (lin-c-Kit⁺). Transcritos para NIC fueron detectados en las poblaciones estromales y endoteliales, confirmándose así la actividad del vector SCL-NIC en las células del nicho medular (figura17C).

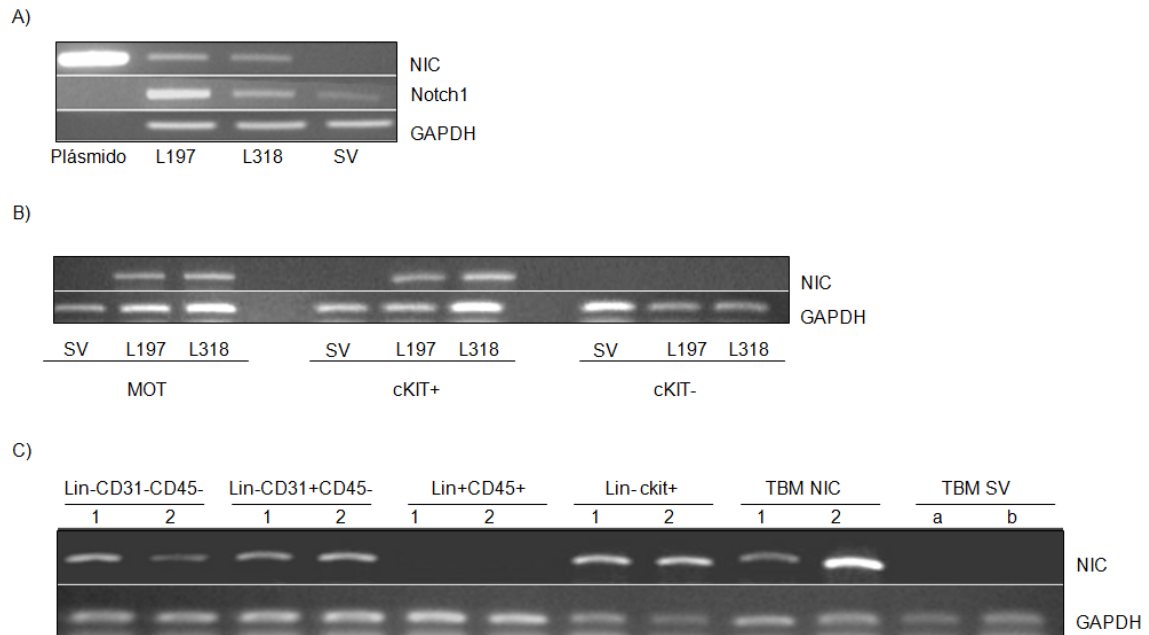


FIGURA 17. Determinación de la expresión de transcritos para NIC mediante RT-PCR. **A)** Determinación de la especificidad de los oligonucleótidos empleados para la determinación de NIC y del gen endógeno Notch1 mediante RT-PCR. El RNA se obtiene de células de médula ósea total de las correspondientes líneas transgénicas para SCL-NIC y animales silvestres (SV). Como control positivo para la PCR-NIC se emplea DNA del plásmido SCL-3'Enh-NIC. Como control endógeno de transcripción, se emplean oligonucleótidos para ampliación de RNA del gen GAPDH. Los oligonucleótidos para NIC no amplifican transcritos para Notch1 en los animales no transgénicos. **B)** Análisis de la expresión de transcritos NIC en la población lin-c-Kit+. El RNA se obtuvo a partir de células de médula ósea total (MOT) y fracciones celulares lin-cKit+ y lin-cKit-, de las líneas transgénicas y animales silvestres (SV). No se observa expresión de transcritos NIC en las células c-Kit- de transgénicos NIC. Cada banda representa un ratón de tres analizados de cada línea. **C)** PCR para detección de NIC en cDNA obtenido a partir de células sorteadas Lin-CD31-CD45- (estromales), Lin-CD31+CD45- (endoteliales), lin+CD45+ (hematopoyéticas), lin-cKit+ (progenitoras) de ambas líneas transgénicas 197 (1) y 318 (2) y de médula ósea transgénica NIC y silvestre (muestras a y b), empleadas como control.

La presencia de RNA para NIC no garantiza completamente que la proteína se esté produciendo de forma eficiente. Para determinar si las células c-kit+ expresaban la proteína NIC en nuestros ratones, se analizó mediante tinción con anticuerpos específicos y citometría de flujo la expresión de Flag, un péptido de 9 aminoácidos fusionado a la secuencia de NIC (Figura 13 materiales y métodos).

El análisis por FACS muestra que en torno al 4-5% de las células de médula ósea de los animales transgénicos SCL-NIC, son positivas para Flag en comparación con los animales silvestres. Así mismo, aproximadamente un 1% coexpresa c-Kit y Flag (Figura 18) en ambas líneas transgénicas. Estos datos ponen de manifiesto que la

proteína NIC es producida en una fracción de progenitores c-Kit⁺, similar a lo publicado para el vector control SCL-PLAP (Silberstein, Sanchez et al. 2005).

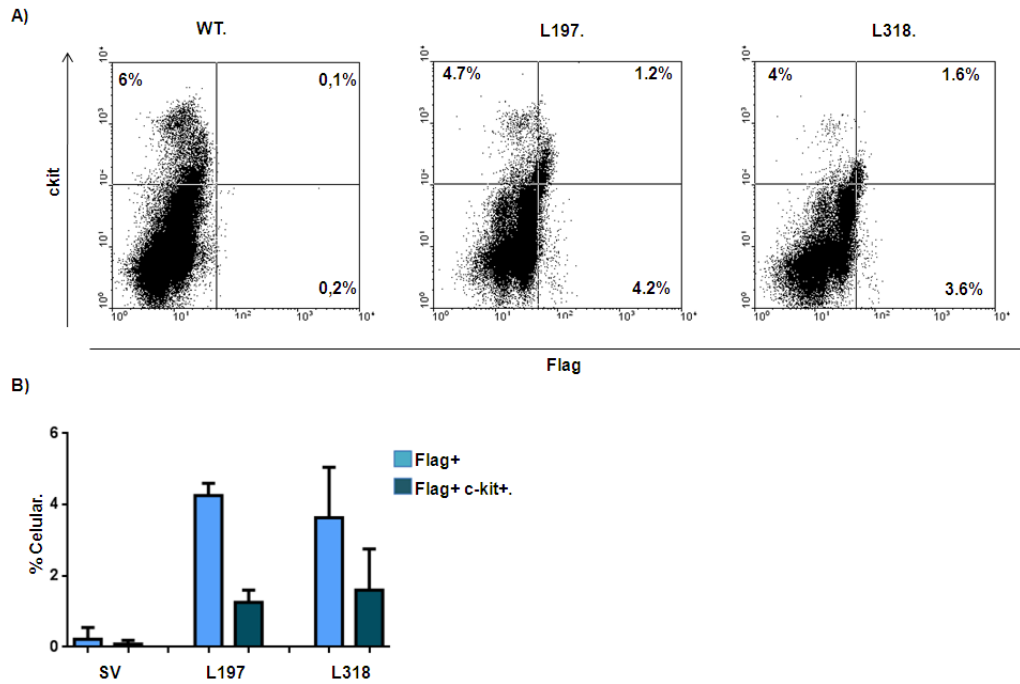
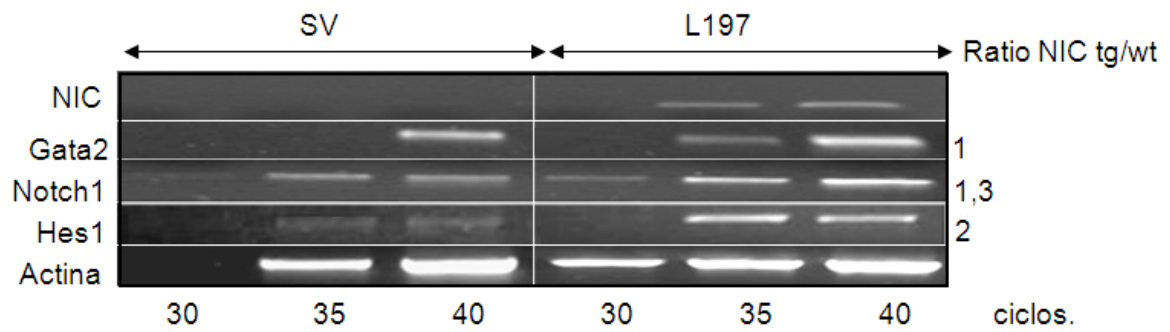


FIGURA 18. Análisis por citometria de flujo de la expresión de SCL-NIC mediante tinción con anticuerpo Flag en médula ósea. **A)** Células de médula ósea se obtienen de animales transgénicos y silvestres. Las células se incuban con anticuerpo anti ckit conjugado con PE para detectar el antígeno de membrana. Posteriormente, se permeabilizan e incuban con anticuerpo anti-FLAG conjugado con FITC para detectar la proteína de fusión NIC-FLAG en el citoplasma. Los niveles de expresión se determinan por citometria de flujo. Se muestran dot-plots representativos de un experimento. Se realizan 3 experimentos diferentes. **B)** Histograma representado la media de los valores obtenidos en los 3 experimentos. La media de expresión de Flag en la población c-kit es: SV- 0,1±0,01; L197: 1,2±0,3; L318: 1,6±0,5. Los cuadrantes se establecen respecto a controles negativos no teñidos.

1.2. Determinación del Efecto de la Expresión de NIC en los Genes Regulados por Notch: GATA2, Notch1 y Hes1.

Los niveles de expresión de diferentes genes se ven afectados, directa e indirectamente, por la activación de la ruta de señalización de Notch. Clásicamente, se consideran Hes1 y Notch1, como genes directamente modulados por Notch en la mayoría de los contextos celulares (Iso, Kedes et al. 2003). En progenitores hematopoyéticos, se ha demostrado además, una regulación directa del factor de transcripción GATA2 durante la embriogénesis (Robert-Moreno, Espinosa et al. 2005). Para determinar si la expresión de la forma activa de Notch empleada en este trabajo, incide en los niveles de expresión de genes modulados directamente por Notch, se analizaron por RT-PCR semicuantitativa los niveles de expresión de transcritos para Notch1, Hes1 y GATA2 en las células de médula ósea. El ratio del nivel de expresión transgénico/silvestre (tg/sv), muestra un incremento de expresión para Notch1 y Hes1 en células derivadas de ambas líneas transgénicas SCL-NIC, lo que sugiere una supra-activación de la ruta en células de médula ósea (Figura 19).

A)



B)

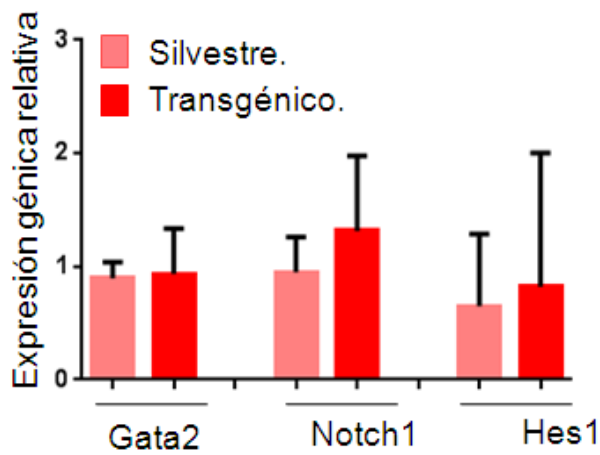


FIGURA 19. RT-PCR semicuantitativa para Notch1 Hes1 y GATA2 en células de médula ósea total. **A)** Se muestran geles representativos teñidos con bromuro de etidio con los productos de amplificación por PCR a diferentes ciclos en ratones silvestre (SV) y transgénico (L197). La cantidad de producto amplificado se determina por densitometría de bandas y cuantificación con software GelPro. El ratio NIC tg/sv muestra el incremento de expresión en las células transgénicas respecto a las silvestres tras corregir los valores respecto a la cantidad de actina para el ciclo 40. **B)** Representación en histogramas de la cuantificación relativa de la expresión de genes en médula ósea obtenida a partir de la determinación por densitometría de la intensidad de banda a 40 ciclos. Media de tres experimentos. Resultados similares fueron obtenidos para la línea 318.

Para determinar si el incremento de transcripción de los genes diana de Notch es específico en los progenitores lin- c-Kit⁺, se cuantificaron los transcritos por PCR a tiempo real (Q-PCR), una técnica más sensible y óptima cuando se trabaja con un bajo número de células. Coincidiendo con los resultados obtenidos por RT-PCR, las células de médula ósea total de las líneas transgénicas presentaban niveles de transcripción para Notch1 y Hes1, dos veces más elevados que el control. También se observaron niveles significativamente incrementados para GATA2, previamente no detectados por RT-PCR (Figura 20A). El análisis del cDNA de poblaciones celulares lin- c-Kit⁺ mostró un incremento específico de transcritos GATA2 ($2 \pm 0,8$), Notch1 ($2,4 \pm 0,4$), y Hes1 ($2,3 \pm 0,6$), en las líneas transgénicas respecto al control no transgénico. Dicho incremento no se detectó en la población de células lin+cKit⁻ (Figura 20B). Estos datos demuestran una supra-activación específica de la ruta de Notch en células madre y progenitores lin-c-Kit⁺ de médula ósea de adulto derivadas de transgénicos SCL-NIC.

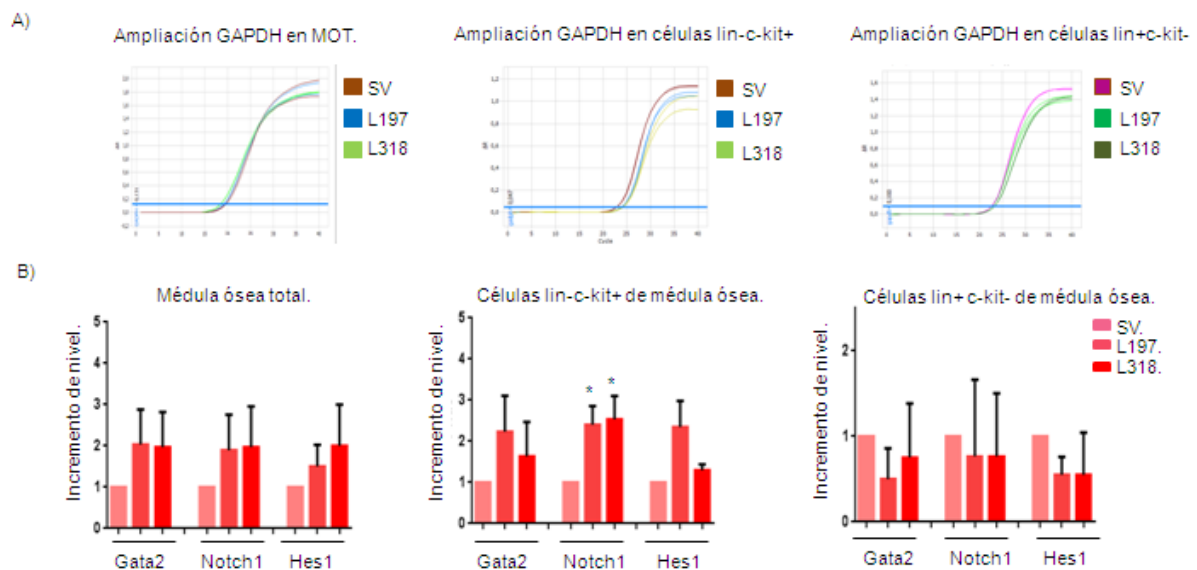


FIGURA 20. PCR a tiempo real para cuantificación relativa de genes diana de Notch en células progenitoras lin-c-kit⁺ de médula ósea. **A)** El valor Ct muestra que el nivel de expresión para Gapdh es constante (entre los rangos 20-25) para una concentración total de cDNA entre 22-25 ng/μl **B)** Histogramas representado valores medios del incremento de niveles de expresión para transcritos de GATA2, Notch1 y Hes1 en médula ósea total y en poblaciones celulares lin-ckit⁺ y lin+ckit⁻. Todos los valores están corregidos respecto al control GAPDH. Se muestra la media de tres experimentos en cada caso. (*) valores significativamente diferentes al control $p < 0.01$.

En conjunto, respecto al análisis de la especificidad de expresión de la forma activa de Notch1, NIC, bajo el control del vector SCL3'Enh se concluye que:

- a) El vector SCL-NIC se expresa en células progenitoras lin-c-Kit⁺ de médula ósea a nivel de RNA y de proteína.
- b) La expresión de SCL-NIC induce el incremento de genes regulados por Notch en células lin-c-Kit⁺.

Estos experimentos muestran la funcionalidad del transgen SCL-NIC en progenitores hematopoyéticos.

1.3. Análisis Fenotípico de los Ratones Transgénicos SCL-NIC.

Con el fin de conocer si los ratones transgénicos SCL-NIC presentaban alguna alteración en su hematopoyesis, se determinó la frecuencia de progenitores hematopoyéticos y de los diferentes linajes celulares en distintos órganos hematopoyéticos (médula ósea, bazo y timo), mediante análisis por citometría de flujo de la expresión de marcadores específicos.

1.3.1. Análisis fenotípico de la médula ósea.

Para determinar si se produce un incremento en el número de células progenitoras c-Kit+, similar al mostrado en estudios previos empleando potentes vectores de expresión víricos con NIC (Varnum-Finney, Wu et al. 2000; Stier, Cheng et al. 2002), se analizó por FACS el porcentaje de células lin-c-Kit+ en médula ósea. Los datos muestran que no hay diferencias significativas ni en el número ni en la frecuencia de la población lin-c-Kit+ (silvestre $2,1 \pm 0,6$; L197 $2,7 \pm 0,6$; L318 $2,4 \pm 0,7$), (Figura 21A).

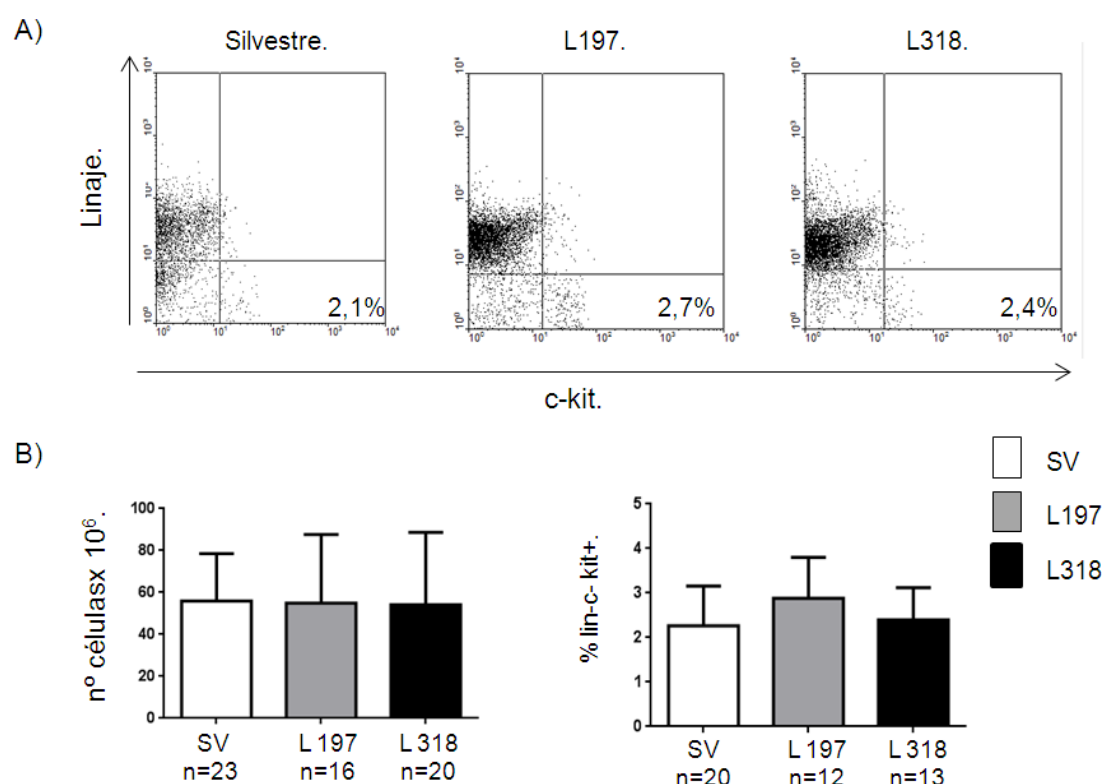


FIGURA 21. Frecuencia de progenitores hematopoyéticos en médula ósea. **A)** Células de medula ósea de ratones transgénicos SCL-NIC de las líneas L197 y L318 se analizan por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células lin-c-kit+ junto con ratones silvestres como control. Se muestran dot-plots representativos. Como linaje se incluyen anticuerpos B220 (células B), Mac1 (macrófagos), CD4 y CD8 (células T) y Ter119 (eritrocitos). **B)** El histograma de la izquierda representa el valor medio del número total de células en médula ósea obtenidas del fémur y la tibia de las dos patas posteriores. El histograma de la derecha representa el valor medio del porcentaje de células progenitoras lin-c-kit+ en cada línea. No se observan diferencias significativas. Análisis t de student con varianzas diferentes. N representa el número de animales analizados.

Sin embargo, el análisis de otras poblaciones hematopoyéticas en médula ósea mostraba una pequeña pero estadísticamente significativa, disminución de linfocitos B B220+, en concordancia con otras publicaciones (Pui, Allman et al. 1999), mientras que no se apreciaban variaciones en las células mieloides (Mac1+), poblaciones de linfocitos T (CD4+, CD8+ y CD4+CD8+), ni eritrocitos (Ter119+) (Figura 22).

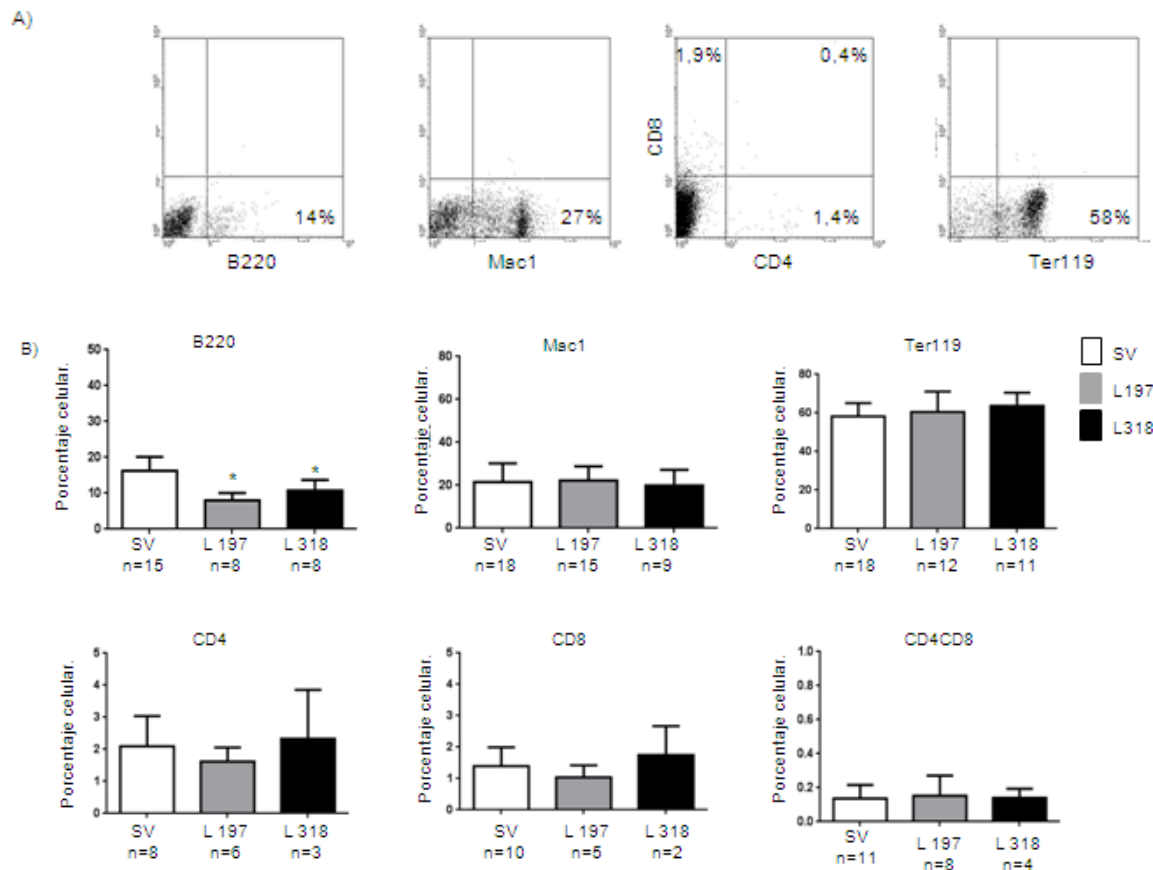


FIGURA 22. Análisis de las poblaciones celulares en médula ósea mediante citometría de flujo. **A)** Dot-plots representativos de las diferentes poblaciones estudiadas. B220: células B, Mac1: mieloides, CD4 y CD8: células T y Ter119: eritrocitos en línea silvestre. **B)** Media de porcentajes para cada población en las líneas transgénicas 197 y 318, y en la línea silvestre. Se observa una reducción significativa de la población B220 en la médula ósea de los transgénicos SCL-NIC (análisis t de student, $p < 0,05$).

En general, el fenotipo de medula ósea de los animales SCL-NIC no presenta variaciones drásticas con respecto a los ratones silvestres en comparación con trabajos previos donde se analizan los porcentajes de poblaciones en médula de animales repoblados con CMHs transfectadas con vectores víricos NIC (Stier, Cheng et al. 2002).

Las causas de estas diferencias podrían estar relacionadas con el hecho de que, en nuestro modelo transgénico, la expresión de NIC se da también en las células de nicho (Figura 17), y por tanto, existe una posible activación de la señalización Notch, produciéndose un efecto compensatorio de la activación de Notch en células madre y progenitores hematopoyéticos resultando en una hematopoyesis "normalizada" (Calvi, Adams et al. 2003).

1.3.2. Análisis fenotípico del bazo y el timo en transgénicos SCL-NIC.

También se determinó el número de células, y la frecuencia de distintas poblaciones celulares en el bazo y el timo. No se observaron diferencias significativas en comparación con los ratones silvestres (Figura 23).

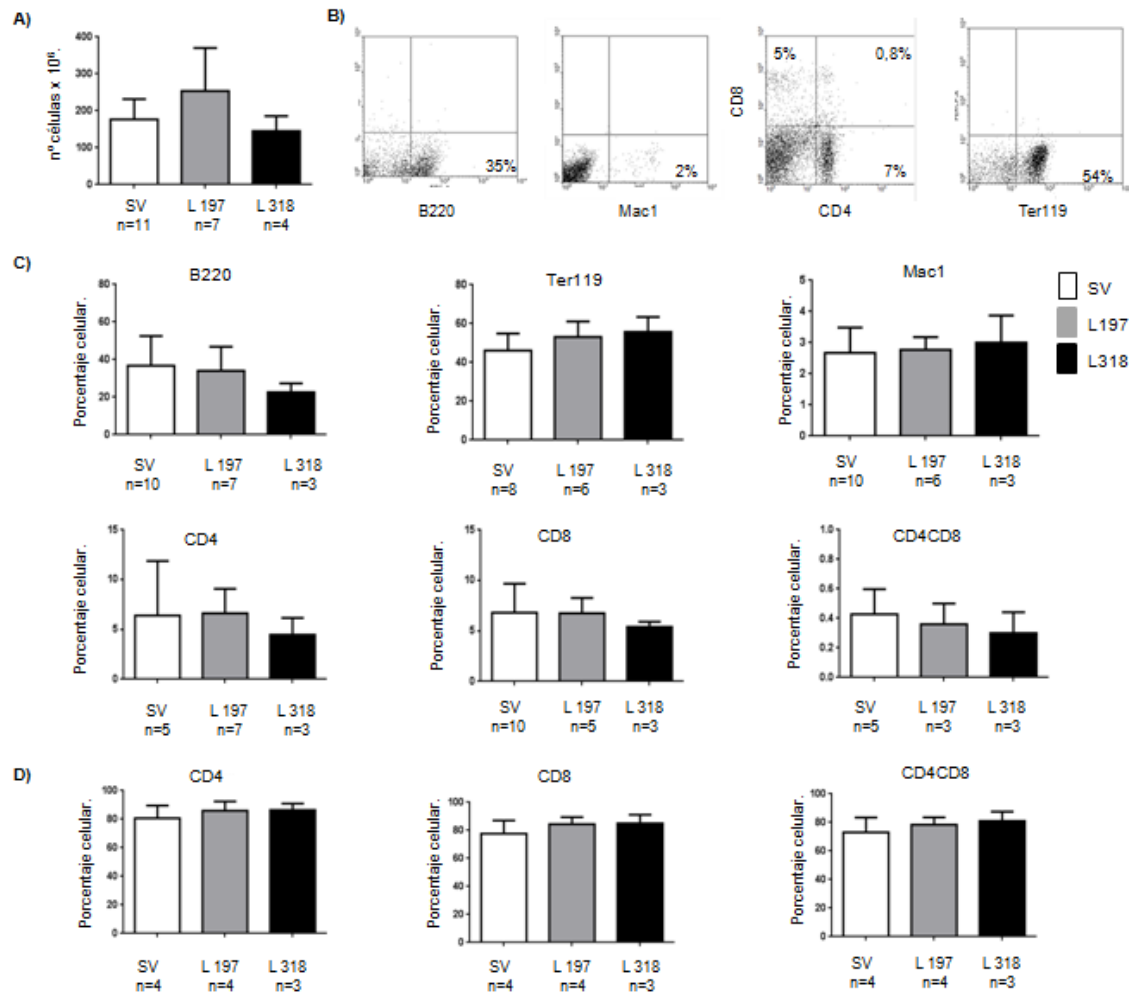


FIGURA 23. Análisis de poblaciones celulares en bazo y timo de animales transgénicos SCL-NIC adultos. **A)** Número de células en el bazo de los ratones silvestres y transgénicos. **B)** Dot-plots representativos del análisis de poblaciones celulares del bazo en un animal de la línea L197. **C)** Porcentaje de las distintas poblaciones celulares en el bazo de los animales estudiados. **D)** Porcentaje de las poblaciones celulares en el timo. Análisis estadístico t de student.

En general, el vector no induce cambios fenotípicos que determinen un desequilibrio en la homeostasis del sistema hematopoyético de los animales transgénicos, excepto una disminución en los linfocitos B en la médula ósea.

2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA DE ADULTO DERIVADAS DE TRANSGÉNICOS SCL-NIC.

Para determinar el efecto intrínseco o autónomo-celular de la expresión de NIC en las CMHs, se realizaron ensayos de repoblación del sistema sanguíneo. Se empleó el modelo de trasplante intravenoso en ratones neonatos silvestres tratados con busulfán (Yoder, Cumming et al. 1996), y valoración de la capacidad de repoblación hematopoyética a largo plazo (>5 meses) utilizado en trabajos previos del grupo (Dekel, Metsuyanin et al. 2008; Garcia-Ortega, Canete et al. 2010).

Se trasplantaron 5×10^6 células procedentes de médula ósea de animales control transgénicos SCL-PLAP (línea L1791 con el vector reportero, SV^{PLAP}), y células procedentes de dobles transgénicos SCL-PLAP;SCL-NIC (líneas L197-NIC^{PLAP} y L318-NIC^{PLAP}) (Garcia-Ortega, Canete et al. 2010). Empleando PCR-PLAP semicuantitativa en gDNA genómico obtenido a partir de sangre periférica, se estimó la cantidad de células donantes en circulación. Se consideró que los animales habían sido injertados cuando la presencia de células donantes PCR-PLAP+ era superior al 1% (Szilvassy, Humphries et al. 1990; Sanchez, Holmes et al. 1996). Así mismo, se cuantificó la presencia de células NIC+ por PCR-NIC semicuantitativa.

Los ratones trasplantados con células de médula ósea transgénica NIC^{PLAP} de ambas líneas L197 y L318, presentaban una frecuencia de repoblación reducida (media de animales repoblados 25% y 18% respectivamente), en comparación con la capacidad de las células silvestres (media de animales repoblados 68%) (Figura 24). En cuanto al nivel de repoblación de cada individuo, no se observaron diferencias entre las quimeras generadas con células silvestres o transgénicas NIC, pudiéndose encontrar quimeras tanto de alto (10-100%), como de bajo nivel (1-10%), en ambos casos. Así mismo, los animales injertado con células NIC^{PLAP} presentaban injerto multilínaje a largo plazo (>5 meses) (seis animales de cada grupo) (Figura 24C).

Considerando que los animales injertados con células NIC no presentaban alteraciones, se comprobó si seguían expresando la proteína NIC-FLAG (Figura 25), descartando por tanto, que la interrupción en la expresión del transgen NIC en los animales trasplantados fuese la causa de la normalidad en la repoblación multilínea.

Tampoco se observaron alteraciones en los porcentajes de linfocitos T, B o células mieloides en médula ósea y bazo de las quimeras NIC^{PLAP}, descartando la posibilidad de expansión monoclonal relacionada con la aparición de leucemias (datos no mostrados).

Por tanto, los datos mostrados en este apartado indican una deficiente capacidad de repoblación de las CMHs derivadas de los ratones NIC. Sin embargo, una vez injertadas, pueden diferenciarse a todos los linajes y no inducen patologías leucémicas.

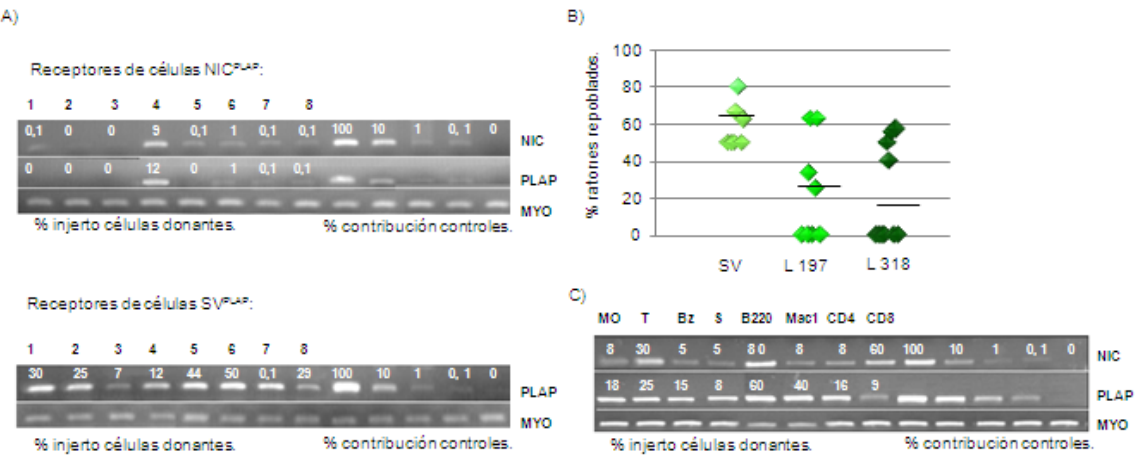


FIGURA 24. Análisis de injerto a largo plazo en sangre periférica en animales trasplantados con células de médula ósea adulta. **A)** Estimación por PCR-PLAP y PCR-NIC semicuantitativa de la señal de células donantes en animales trasplantados con médula ósea. Geles representativos de un experimento mostrando el producto de amplificación PCR del gDNA de sangre periférica para cada uno de los receptores trasplantados con células de médula ósea de animales transgénicos NIC^{PLAP} y silvestre SV^{PLAP} 6 meses postrasplante (receptores 1 a 8) junto con la escalera de diluciones seriadas para cada marcador (100% al 0%). El porcentaje de contribución de cada muestra se indica encima de cada línea. **B)** Frecuencia de repoblación de animales trasplantados con médula ósea determinado mediante PCR. Cada punto representa el porcentaje de repoblación de un experimento donde se analizan entre 3-5 animales trasplantados. El número de experimentos analizados es SV n=10; L197 n=7; L318 n=9. En cada experimento se analizan 3-6 animales **C)** Determinación de la contribución de las células donantes a diferentes linajes celulares en médula ósea. El gDNA se obtuvo de los diferentes órganos (MO, médula ósea; T, timo; Bz, bazo; S, sangre periférica), y diferentes poblaciones de médula ósea (B, B220+; mieloides, Mac1+; T, CD4; T, CD8), determinándose por PCR semicuantitativa los marcadores de las células donantes. El producto de amplificación para la Miogenina –Myo–, se emplea como control endógeno. Para la determinación de la densidad de banda y cuantificación se emplea el Thyphoon y el software de cuantificación GelPro Analyzer.

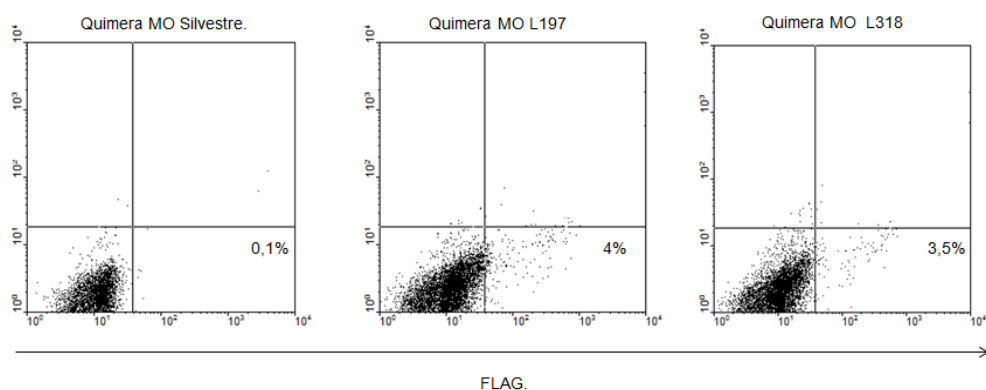


FIGURA 25. Análisis de la expresión de FLAG en médula ósea de quimeras transcurridos cinco meses desde el trasplante, mediante citometría de flujo. Dot-plots representativos de un experimento. Dos animales fueron analizados por tipo de quimera.

2.1. Estimación de la Frecuencia de Células Madre Trasplantables en Médula Ósea Adulta de Transgénicos SCL-NIC.

Con el fin de determinar si la disminución en la frecuencia de repoblación en las células de médula ósea de los ratones transgénicos SCL-NIC, pudiera deberse a un menor número de células madre hematopoyéticas funcionales, se realizaron trasplantes con diluciones límite de médula ósea total, y se estimó el número de CMHs mediante estadística de Poisson. Se empleó como marcador de células donantes el vector actina-DsRed, que expresa la proteína fluorescente DsRed de forma ubicua (Vintersten, Monetti et al. 2004). Animales trasplantados con diferente número de células de médula (10^6 , $0,5 \times 10^6$ y $0,25 \times 10^6$ células/receptor), procedentes de donantes dobles transgénicos NIC^{DsRed} (SCL-NIC x act-DsRed), y controles SV^{DsRed} fueron analizados a los cinco meses post-trasplante, cuantificándose el porcentaje de células donantes DsRed+ en sangre periférica por citometría de flujo. Los animales que presentaban $>1\%$ de células donantes en sangre periférica, se consideraron positivos para injerto (Figura 26). De esta forma, se determinó que la frecuencia de CMHs funcionales es entre 6 a 7 veces inferior en la médula ósea de los ratones transgénicos SCL-NIC en comparación con los ratones silvestres.

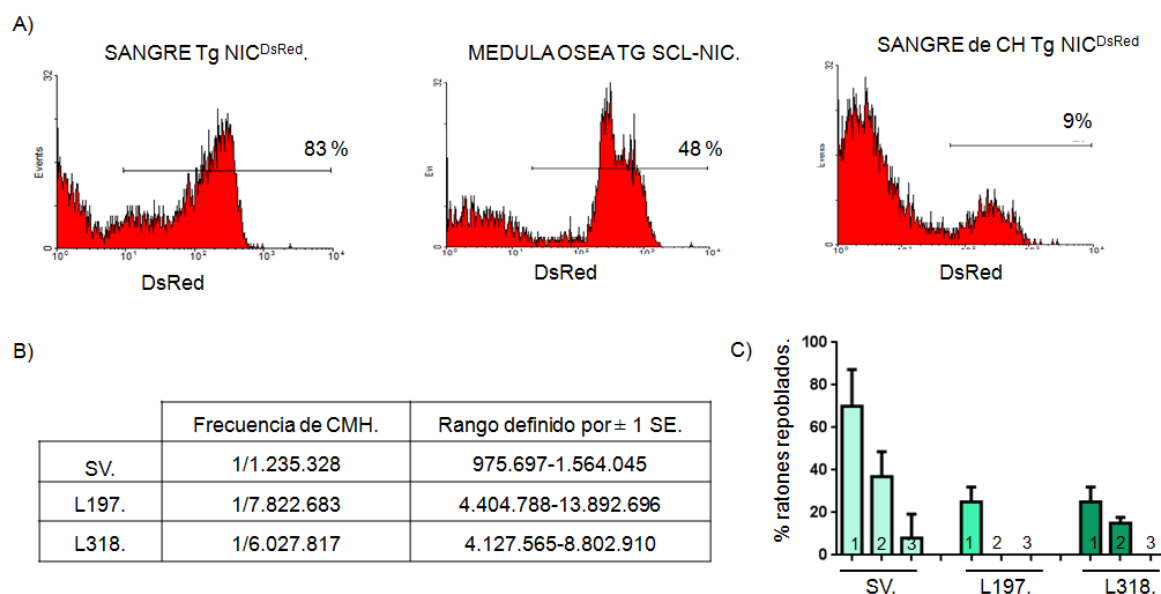


FIGURA 26. Estimación de la frecuencia células madre en médula ósea de transgénicos SCL-NIC. **A)** Análisis mediante citometría de flujo del nivel de expresión en sangre y médula ósea del marcador DsRed en un animal silvestre SV^{DsRed}, otro transgénico SCL-NIC^{DsRed} y una quimera (CH), un mes tras el trasplante. **B)** Determinación de la frecuencia de CMHs trasplantables. Los ratones SCL-NIC presentan una disminución en células madre hematopoyéticas funcionales. Animales receptores silvestres son trasplantados con diferente número de células de médula ósea de ratones SV^{DsRed}, L197-NIC^{DsRed} y L318-NIC^{DsRed} y se analiza la frecuencia de repoblación con el programa L-Call de StemCells. Se consideran positivos cuando el nivel es $>1\%$. **C)** Histograma de barras representativo de la frecuencia de animales repoblados de cada línea para cada dilución celular indicada en cada columna por los números 1= $1 \cdot 10^6$; 2= $0,5 \cdot 10^6$; 3= $0,25 \cdot 10^6$ células respectivamente a los 4 meses post-trasplante. Cada experimento fue repetido tres veces empleando un total de 8-15 animales por dilución celular.

Para el análisis de repoblación multilínea a largo plazo en quimeras NCS^{DsRed} y SV^{DsRed}, se determinó por FACS la distribución de los diferentes tipos celulares dentro de la población DsRed+ de médula ósea y bazo. No se observaron alteraciones en los porcentajes de linfocitos T, B o células mieloides en ninguna de las localizaciones, descartando la posibilidad de expansión monoclonal relacionada con la aparición de leucemias (Figura 27). Estos datos se correlacionan con los del apartado anterior, y confirman que las células madre que expresan la forma activa SCL-NIC, una vez injertadas, tienen una capacidad de contribución multilínea similar a las células silvestres.

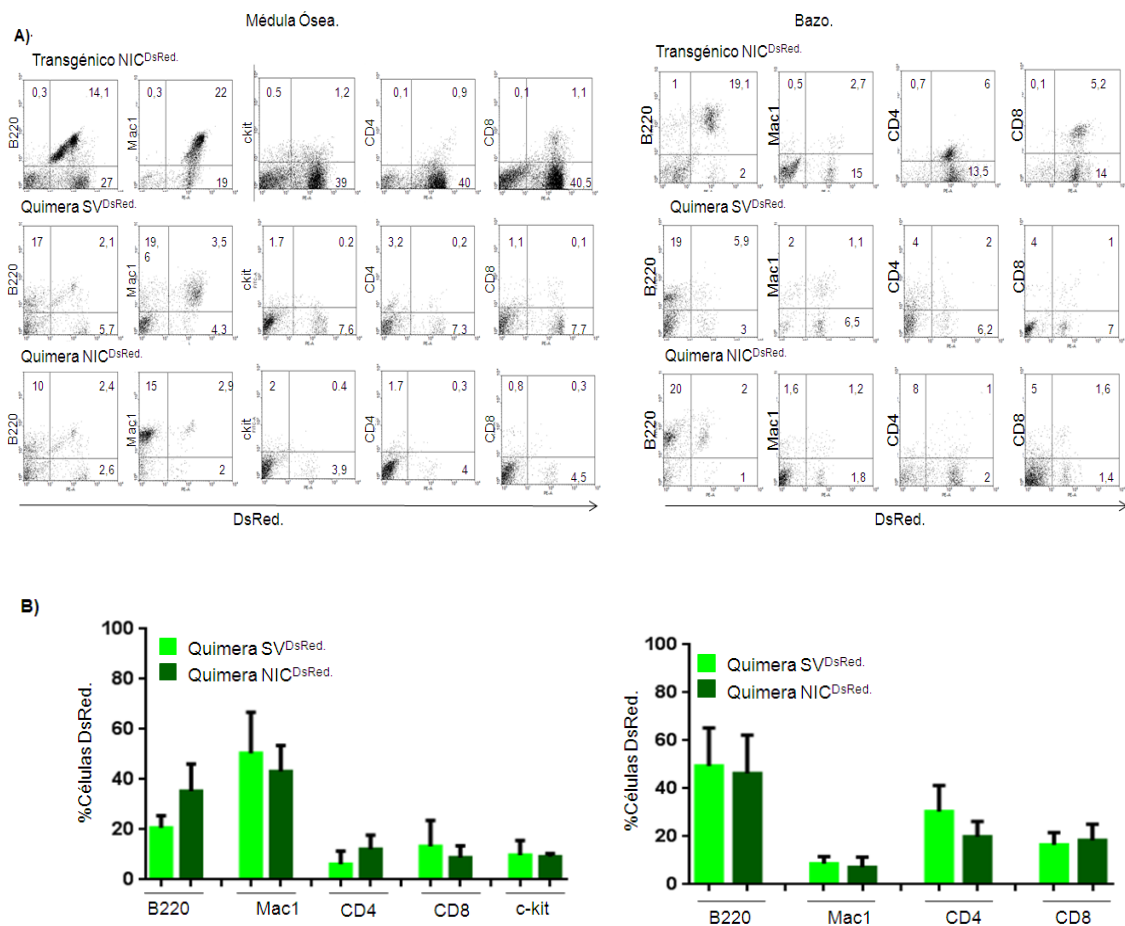


FIGURA 27 Repoblación multilineal en trasplantes analizados a largo plazo con células de médula ósea de animales SCL-NIC;DsRed. Animales trasplantados con células de médula ósea de las líneas NIC^{DsRed} y SV^{DsRed} se analizan a los 5 meses postrasplante determinando mediante FACS la contribución de células donantes a los diferentes linajes en médula ósea y bazo. **A)** Representación de dot-plots para los diferentes marcadores en médula ósea y bazo, derivados de los ratones transgénicos y quimeras NIC^{DsRed} y SV^{DsRed}. **B)** Histogramas representando la media de la contribución a cada linaje celular en la médula ósea (izquierda) y bazo (derecha) de las quimeras NIC^{DsRed} y SV^{DsRed} considerando el nivel de DsRed en cada órgano como el 100% y extrapolando el porcentaje de cada linaje a este valor. No se observan diferencias significativas entre la contribución de células SV y NIC. Datos derivados de 4 quimeras SV^{DsRed} y 5 quimeras NIC^{DsRed}. No se observan diferencias significativas (análisis t de student para varianzas desiguales).

2.2. Cotrasplantes de Progenitores lin-c-Kit⁺ Procedentes de Médula Ósea.

Para determinar de forma más precisa el papel de la expresión de NIC en la funcionalidad de las CMHs de médula ósea, se analizó el potencial de repoblación de la población lin-c-Kit⁺ obtenida a partir de ratones SCL-NIC^{Dsred} (c-kit⁺NIC^{Dsred}), en ensayos competitivos de cotrasplante con 10⁴ células lin- c-Kit⁺ derivadas de ratones control SCL-PLAP, (c-kit⁺SV^{PLAP}). Esta línea control, expresa el gen en un 15%±3 de las células de sangre periférica, mayoritariamente de linaje T (Figura 28A). En las quimeras, este valor lo empleamos como referente del nivel de repoblación 100% de células donantes SV^{PLAP}. Animales con un nivel de células donantes PLAP⁺ >0,1% o de células donantes DsRed⁺ >1% se consideraron positivos para repoblación.

Los animales control cotrasplantados con células silvestres c-kit⁺SV^{Dsred} más c-kit⁺SV^{PLAP} presentaban una frecuencia similar de animales repoblados con células DsRed⁺ y PLAP⁺ (62% Dsred y 60%PLAP) (Figura 28C). Sin embargo, los animales cotrasplantados con células de transgénicos SCL-NIC y silvestre, c-kit⁺NIC^{Dsred} más c-kit⁺SV^{PLAP}, presentaban una drástica disminución de la frecuencia de animales repoblados con células c-kit⁺NIC^{Dsred} (20% DsRed y 60% PLAP).

Considerando que se trasplantaron el mismo número de células progenitoras c-kit NIC y c-kit SV (10⁴ células de cada tipo por receptor), estos resultados confirman que el incremento de función de Notch1 en CMHs afecta a su capacidad de repoblación de forma autónoma.

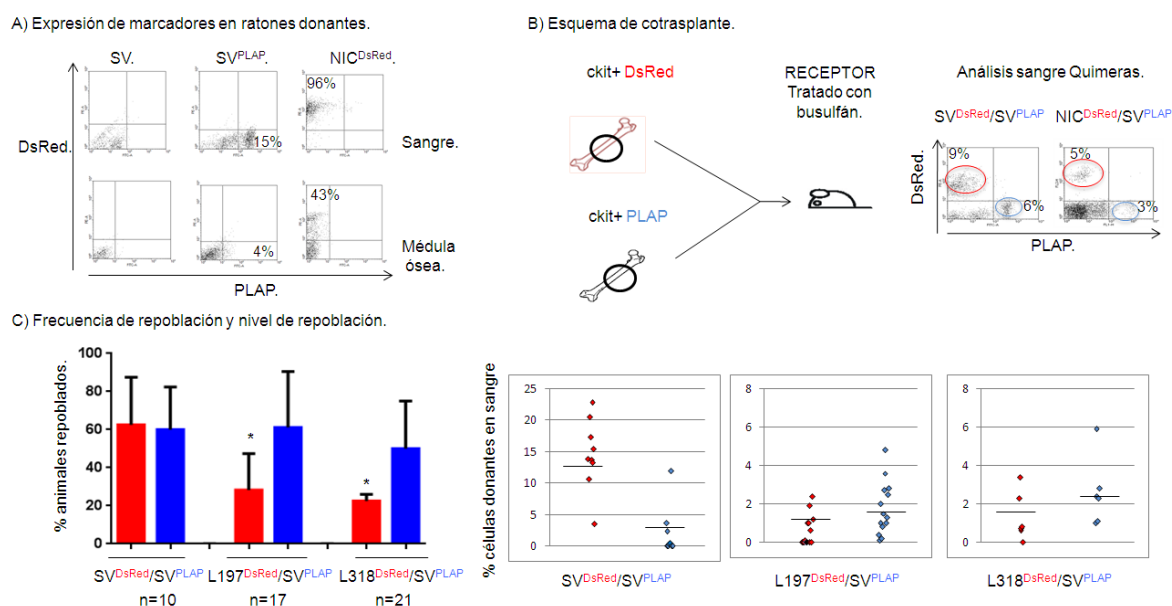


FIGURA 28. Ensayos de cotrasplante. Se inyectan a la vez células lin-c-kit+ procedentes de médula ósea silvestre (marcada con Plap) y transgénica (marcada con DsRed) en receptores silvestres tratados con busulfán. **A)** Expresión de los marcadores genéticos DsRed y Plap en la médula ósea de los donantes. **B)** Esquema de cotrasplante. Se inyectan a la vez células lin-c-Kit+ procedentes de un ratón silvestre y de uno transgénico en la misma proporción. El nivel de injerto es analizado un mes después en sangre periférica mediante citometría de flujo. **C)** Media de porcentaje de animales repoblados en diferentes experimentos tras la inyección de células sorteadas lin-c-Kit+ procedentes de médula ósea transgénica y silvestre en ensayos de cotrasplante. Las células transgénicas llevan el marcador DsRed y las silvestres Plap, excepto en la primera columna donde se muestran ensayos de cotrasplante de células silvestres con los dos marcadores y que sirve de control. Las células procedentes de médula ósea transgénica muestran menor capacidad de repoblación que las silvestres. Se muestran los valores medios de tres experimentos en cada tipo de cotrasplante. A la derecha, se muestra el porcentaje de células donantes en sangre periférica en animales individuales. Se observa una menor contribución de las lin-c-Kit+ NCS^{DsRed}. No hay variaciones entre ambas líneas transgénicas SCL-NIC L197 y L318.

Tres de las quimeras procedentes de cotrasplantes NIC^{DsRed}/SV^{Plap} fueron analizadas a largo plazo (>5 meses), para confirmar que tanto las células transgénicas SCL-NIC (marcadas con DsRed), como las silvestres (marcadas con Plap), contribuyen a los diferentes linajes hematopoyéticos en proporción similar (figura 29).

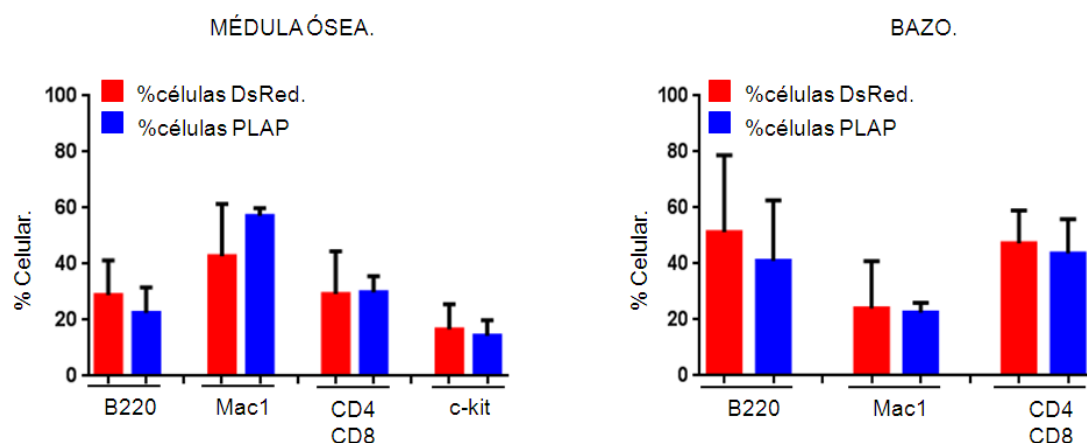


FIGURA 29. Repoblación multilineaje en cotrasplantes analizados a largo plazo. Animales cotrasplantados con células lin⁻ c-kit⁺ de médula ósea de las líneas NIC^{DsRed} y SV^{Plap} se analizan a los 5 meses post-trasplante determinando mediante FACS la contribución de células donantes a los diferentes linajes en médula ósea y bazo. Se muestran histogramas representando la media de la contribución a cada linaje celular en la médula ósea (izquierda) y bazo (derecha) de las quimeras NIC^{DsRed}/SV^{Plap} considerando el nivel de DsRed y Plap en cada órgano como el 100%, y extrapolando el porcentaje de cada linaje a este valor. No se observan diferencias significativas entre la contribución de células SV y NIC. Datos derivados de 3 quimeras NIC^{DsRed}/SV^{Plap}.

2.3. Cinética de Reconstitución Hematopoyética a Corto Plazo.

El defecto en la capacidad de repoblación de las células transgénicas SCL-NIC puede estar relacionado con un problema en el anidamiento (homing), o con la estabilización de las células donantes en la médula ósea del receptor. Para estudiar este punto, se transfirieron 10^6 células de médula ósea de transgénicos NIC^{Dsred} y controles SV^{Dsred}, y se determinó a cortos intervalos el porcentaje de células donantes DsRed⁺ en circulación y en médula ósea a diferentes días post-trasplante. Transcurridas de 15-17 horas, no se observaron diferencias en la frecuencia de células DsRed en circulación entre los animales trasplantados con células control SV^{Dsred} ($0.5\% \pm 0.01$) y los trasplantados con células NIC^{Dsred} ($0.4\% \pm 0.02$). En la médula ósea tampoco se observaron diferencias (Figura 30). Estos datos indicarían que las células SCL-NIC no presentan problemas de anidamiento en médula ósea, aunque considerando que los valores obtenidos son extremadamente bajos ($< 0.05\%$), no se puede asegurar la robustez de los datos.

A los 10 días post-trasplante, se observó una drástica disminución de células DsRed⁺ en la médula ósea de los animales trasplantados con células NIC^{Dsred} ($1\% \pm 0.01$),

comparado con el control ($3\% \pm 0.02$), a pesar de obtener niveles similares en circulación (Figura 30A). A los 30 días, el porcentaje de células DsRed+ en la médula de los ratones trasplantados con células NIC^{DsRed} sigue siendo menor que en los controles SV^{DsRed} (media 5% vs 25%). Además, el porcentaje de células donantes en circulación también disminuyó drásticamente en las quimeras SCL-NIC en comparación con las quimeras control (media 3% vs 33%) (Figura 30A), lo que parece indicar que el aporte de nuevas células procedentes de médula ósea se ve comprometido.

Por tanto, la activación de Notch probablemente no interfiera en el proceso de homing en la médula ósea, pero si afecta a la estabilización de células madre y/o progenitores.

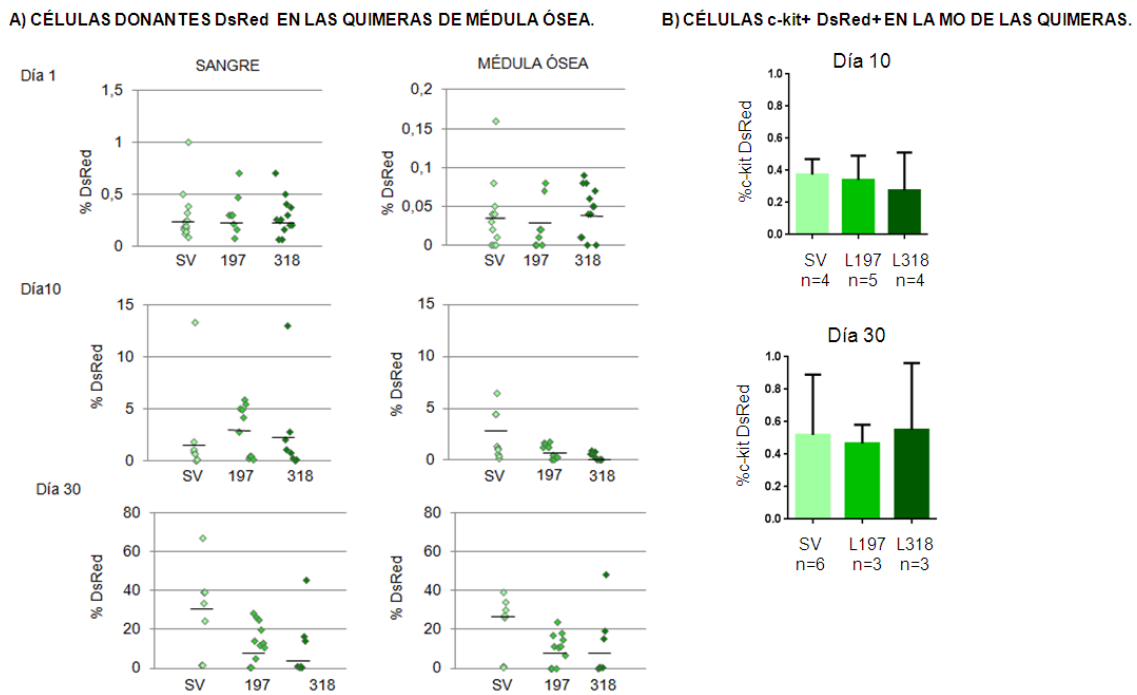


FIGURA 30 Análisis de la cinética de repoblación a corto plazo de las quimeras de médula ósea. **A)** Análisis del porcentaje de células DsRed positivas en sangre y médula ósea de las quimeras, procedentes de médula ósea de las líneas transgénicas para NIC y de la línea silvestre 1, 10 y 30 días tras el trasplante. **B)** Análisis del porcentaje de células c-kit+DsRed+ en la médula ósea de las quimeras generadas con células de médula ósea silvestre (SV), y de las líneas transgénicas L197, L318 a los 10 y 30 días post-trasplante.

Para determinar si la disminución de células DsRed positivas en la médula ósea de las quimeras generadas con células SCL-NIC^{DsRed}, a los 10 y 30 días post-trasplante se correspondía con una disminución de progenitores, se analizó el porcentaje de células c-kit+DsRed mediante citometría de flujo. Tanto las quimeras generadas con células silvestres SV^{DsRed}, como las generadas con células NIC^{DsRed}, presentan porcentajes similares de células dobles positivas c-kitDsRed (figura 30B), por lo que la disminución de células donantes DsRed+ en la médula ósea de las quimeras a día 10 y 30 post-trasplante, no se relaciona con una disminución de progenitores.

Recientes estudios han mostrado que la activación de Notch empuja a las células madre a diferenciarse a linfocitos T, produciéndose un incremento pasajero de células dobles positivas CD4+CD8+ a las 4 semanas post-trasplante que desaparecen a partir de las 16 semanas (Chiang, Shestova et al. 2013). Para determinar si existe un problema con la proliferación o diferenciación de las células donantes, se analizaron distintos marcadores en la médula ósea a los 30 días: Mac1 (mieloides), B220 (linfocitos B), CD4 y CD8 (células T) y lin- c-kit+. Los resultados mostraron que en las quimeras generadas con células de médula ósea SCL-NIC el porcentaje de linfocitos B derivados de las células donantes es muy bajo, mientras que el porcentaje de células mieloides, células CD8 positivas y progenitores lin-c-kit+ estaba muy incrementado en comparación con las quimeras generadas con células silvestres (Figura 31B). A pesar de estas variaciones, el porcentaje global de cada linaje celular en la médula ósea no se ve alterado (Figura 31A).

Estos datos indicarían una sobreactivación de la diferenciación de CMHs inducida por la activación de Notch. Esta activación posiblemente lleva a un agotamiento y, a largo plazo, a la desaparición de las CMHs, corroborando datos previamente publicados por otros autores (Chiang, Shestova et al. 2013).

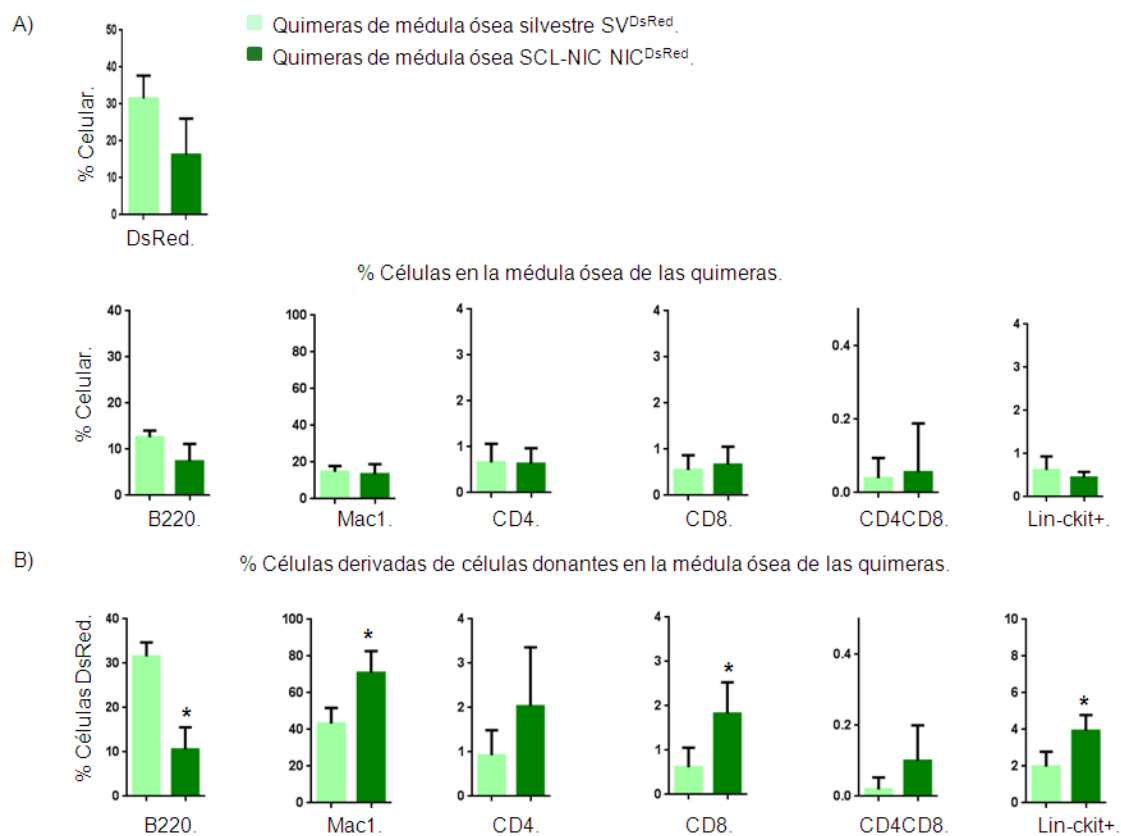


FIGURA 31. Análisis de injerto en médula ósea a corto plazo. Se analiza el fenotipo de la médula ósea de las quimeras generadas con médula ósea NIC^{DsRed} y SV^{DsRed}. **A)** Se muestra el porcentaje celular para los distintos marcadores en la médula ósea de las quimeras. **B)** Análisis por citometría de flujo del porcentaje de cada tipo celular derivado de las células donantes DsRed en la médula ósea de las quimeras. Se analizan un total de cinco quimeras silvestres y nueve quimeras transgénicas NIC. Análisis t de student con varianzas desiguales ($p < 0,05$).

El mismo análisis se realiza en el bazo de las quimeras, observándose una distribución de poblaciones muy similar a la de la médula ósea. En el caso del timo, no se observan diferencias significativas (Figura 32A y B).

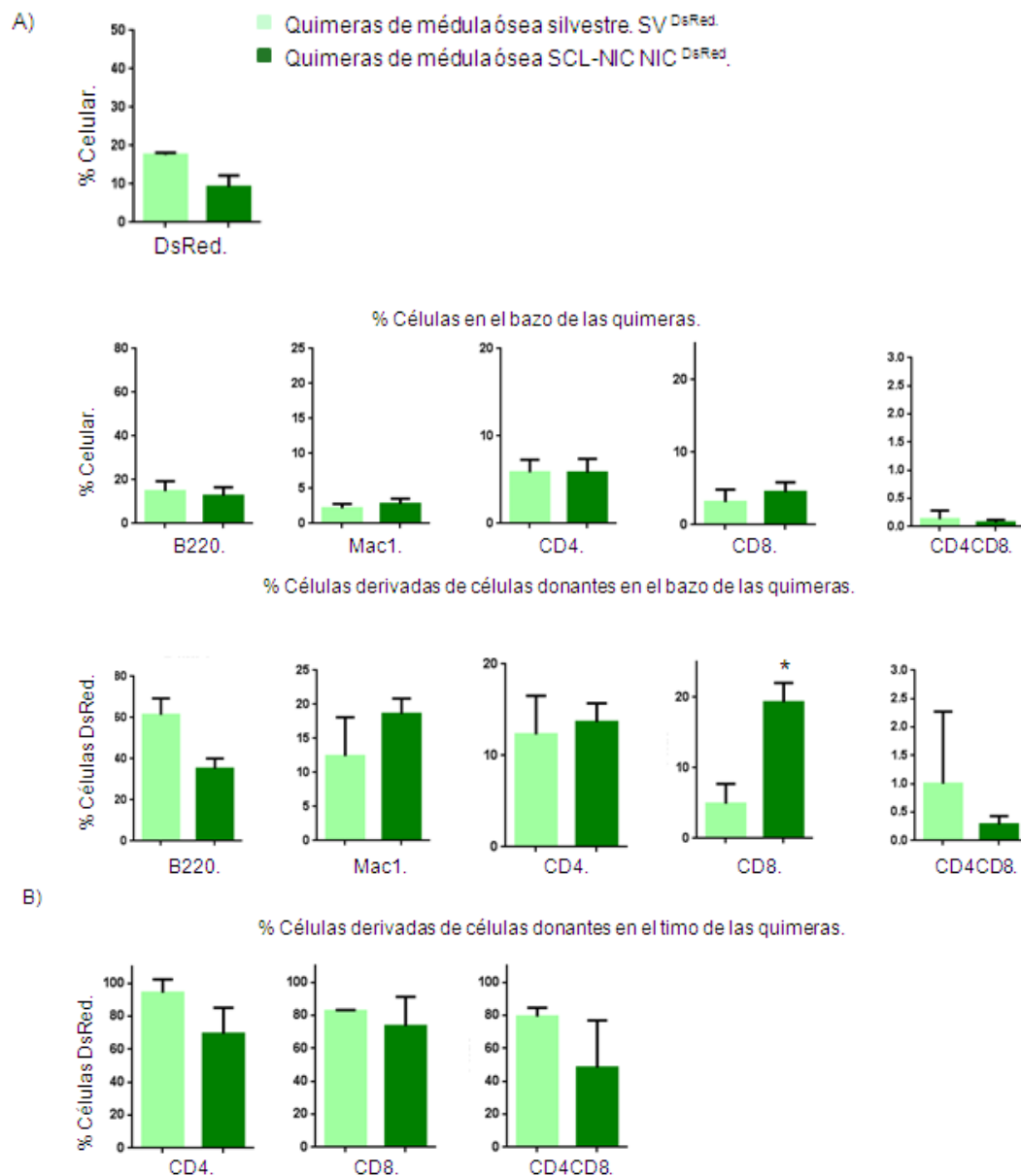


FIGURA 32. Análisis fenotípico del bazo y el timo de las quimeras generadas con médula ósea NIC^{DsRed} y SV^{DsRed}. **A)** En la parte superior se muestra el porcentaje celular para los distintos marcadores de linaje y DsRed en el bazo de las quimeras, en la inferior el porcentaje de cada tipo celular derivado de las células donantes DsRed. **B)** Análisis del porcentaje celular derivado de las células donantes en el timo. Se analizan un total de tres quimeras silvestres y siete quimeras transgénicas NIC en el caso del bazo y dos quimeras silvestres y cinco transgénicas en el caso del timo. Análisis t de student con varianzas desiguales ($p < 0,05$).

2.4. Análisis de Retrotrasplantes. Rescate de la Capacidad de Repoblación de las Células SCL-NIC en Trasplantes en Receptores SCL-NIC.

Como se ha visto, aunque las células transgénicas consiguen anidar sin dificultad en la médula ósea, parece que después no pueden proliferar o diferenciarse adecuadamente y salir al torrente sanguíneo. Dado que se inyectan células con Notch1 activado en un entorno silvestre, es posible que la descompensación en los niveles de Notch sea la causa del defecto que se observa en las CMHs transgénicas adultas. Para comprobar esto, se realizaron retrotrasplantes de CMHs SCL-NIC en receptores recién nacidos de las líneas transgénicas L197 y L318 (NIC-NIC), donde ya se ha demostrado la expresión de NIC en el nicho (figura 17). A la vez, se repitieron los trasplantes de CMHs silvestres en receptores silvestres (SV-SV), y CMHs NIC en receptores silvestres (NIC-SV), para comparar los resultados. En todos los casos, las células donantes van marcadas con PLAP. Se observó que en estos retrotrasplantes, el nivel de repoblación es similar al de las CMHs silvestres en receptores silvestres, es decir, cuando las células SCL-NIC se encuentran en un nicho con niveles incrementados de Notch1 no muestran ninguna alteración en su capacidad de repoblación (figura 33).

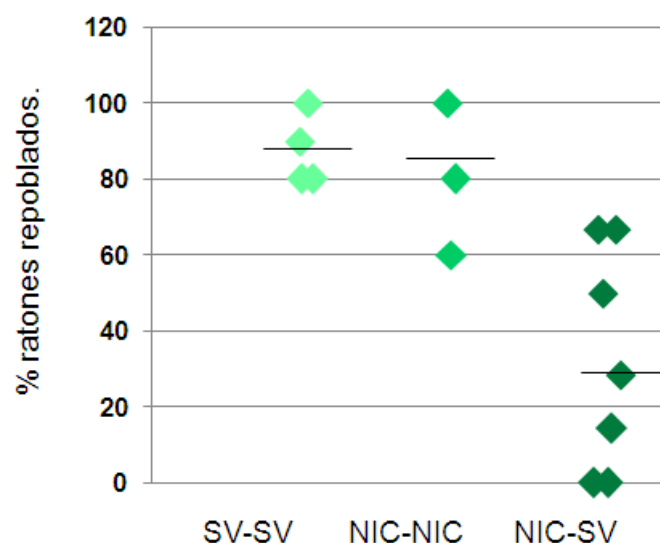


FIGURA 33. Análisis de injerto a largo plazo en sangre periférica de los retrotrasplantes mediante PCR PLAP. Estimación por PCR-PLAP del número de animales repoblados tras ser trasplantados con médula ósea. Cada punto representa el porcentaje de repoblación de un experimento donde se analizan entre 5-8 animales trasplantados. La línea horizontal representa el nivel medio de repoblación en cada caso.

Conclusión punto 2.

Las células donantes NIC^{DsRed}, presentan una capacidad de anidamiento similar a la de las células silvestres. Sin embargo, su número se reduce a los 10 días post-trasplante, lo que indica un defecto en su capacidad de proliferación, diferenciación o sensibilidad a señalización de apoptosis.

A corto plazo, se observa un incremento en todos los linajes celulares incluyendo células c-kit+. Este comportamiento sería consistente con la hipótesis de que la activación de Notch en CMHs, induce su proliferación y diferenciación produciendo, a la larga, agotamiento y extinción. Como resultado, el porcentaje de animales repoblados a largo plazo decrece.

Esta acción de Notch parece estar mediada por el nicho, ya que en retrotrasplantes en receptores SCL-NIC, parece que la repoblación a largo plazo se recupera. Estos datos serían consistentes con la casi ausencia de fenotipo en los ratones transgénicos SCL-NIC.

3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS MADRE DE HÍGADO FETAL DE TRANSGÉNICOS SCL-NIC.

3.1. Análisis Fenotípico del Hígado Fetal de Embriones Transgénicos SCL-NIC.

Las células madre hematopoyéticas fetales presentan características diferentes a las adultas, tales como expresión de marcadores, potencial de diferenciación o capacidad de autorenovación (Morrison, Hemmati et al. 1995; Phillips, Ernst et al. 2000; Ivanova, Dimos et al. 2002; Copley, Beer et al. 2012)). Para analizar si el sistema hematopoyético fetal de los embriones transgénicos SCL-NIC presentaba alguna diferencia con respecto a los animales silvestres, se determinó la especificidad de expresión del transgén y sus características fenotípicas. El análisis se restringió al hígado fetal de día 12 como órgano de estudio de la hematopoyesis fetal.

Para determinar si la expresión de SCL-NIC se encuentra restringida a los progenitores hematopoyéticos lin-c-Kit⁺, tal como viene determinado por el vector de expresión SCL-3'Enh, se aislaron éstos del hígado fetal y, por RT-PCR, se determinó que la expresión de transcritos NIC era específica de progenitores c-Kit⁺ (Figura 34A). Así mismo, el análisis de la expresión de la proteína NIC-FLAG por citometría de flujo muestra que entre el 15 y el 25% de las células de hígado fetal expresan FLAG, de las cuales aproximadamente el 6% son c-kit⁺, confirmando la expresión de la proteína en progenitores fetales (Figura 34B). Al igual que en la médula ósea, el fenotipo del hígado fetal de embriones SCL-NIC, no muestra variaciones significativas con respecto al silvestre en el número total de células, la frecuencia de células c-Kit⁺ o de eritrocitos Ter119⁺ (Figura 34D).

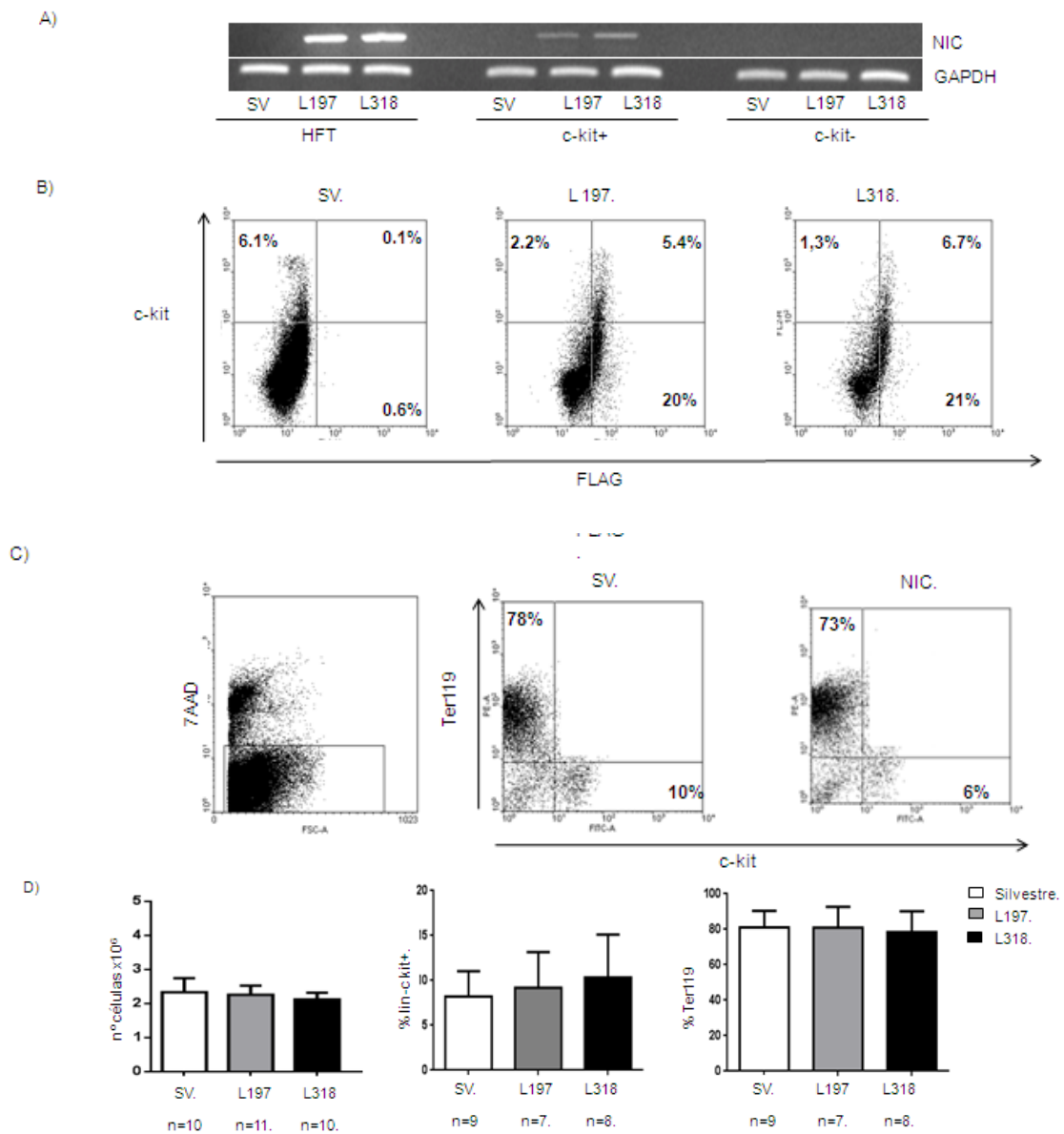


FIGURA 34: Análisis de las células de hígado fetal derivadas de transgénicos SCL-NIC. **A).** Detección de la expresión de SCL-NIC mediante RT-PCR en hígado fetal de un animal silvestre (sv) y en las líneas transgénicas SCL-NIC. Las células c-kit⁺, y c-kit⁻ fueron sorteadas de hígado fetal E12. y el cDNA aislado y sometido a PCR para detección de transcritos NIC. Como control se emplea el gen GAPDH. **B)** Determinación de la expresión de FLAG en la población c-kit⁺ de hígado fetal E12 mediante citometría de flujo. Se muestran dot-plot para embriones individuales. Se analizaron entre 5-8 individuos por línea (SV- 0,1±0,03; L197- 5,4±1,4; L318- 6,6±0,3). **C)** Dot-plots representativos del análisis fenotípico de hígado fetal a día 12 de desarrollo, 7AAD se emplea como marcador de células muertas. **D)** Análisis del número de células en el hígado fetal E12 de los animales silvestres y transgénicos y porcentaje de células progenitoras lin- cKit⁺ y eritroides (Ter119). No se observan diferencias significativas (análisis t de student).

3.2. Estimación de la Frecuencia de Células Madre Trasplantables en el Hígado Fetal de Transgénicos SCL-NIC.

En una primera aproximación, el análisis de la capacidad funcional de las células madre hematopoyéticas de hígado fetal, se llevó a cabo mediante ensayos de trasplante en receptores recién nacidos, al igual que se hizo en la médula ósea. Los embriones empleados procedían de cruces de ratones de la línea $SV^{PLAP} \times SV^{PLAP}$ y $NIC^{PLAP} \times NIC^{PLAP}$. En la mayor parte de los experimentos se emplearon ambas líneas transgénicas SCL-NIC, L197- NIC^{PLAP} y L318 NIC^{PLAP} . Previo al trasplante (1embrión/receptor), cada embrión se fenotipó para determinar la expresión de LacZ (transgén asociado a NIC), y de PLAP, confirmándose el genotipo de cada donante al día siguiente del trasplante mediante PCR-NIC y PCR-PLAP.

La capacidad de repoblación de las células de hígado fetal se analizó a los 5 meses post-trasplante. Por PCR-NIC y PCR-PLAP semicuantitativa del gDNA de células de sangre periférica de los animales receptores, se determinó la presencia de células donantes, observándose que el porcentaje de animales repoblados con células fetales SCL-NIC, es similar al porcentaje de animales repoblados con células silvestres (76% y 75% respectivamente, para L197- NIC^{PLAP} y L318- NIC^{PLAP} , y 80% la línea silvestre SV^{PLAP}). También se determinó en 6 animales de cada grupo que el injerto es multilíneaje, realizando PCR-PLAP y PCR-NIC semicuantitativas en gDNA de diferentes órganos hematopoyéticos y linajes celulares de médula ósea (linfocitos B, T y mieloides). (Figura 35). El análisis fenotípico por citometría de flujo de estos animales, mostraba ausencia de alteraciones en la frecuencia de los porcentajes de linfocitos T, B o células mieloides en médula ósea y bazo de las quimeras NIC^{PLAP} .

Estos datos, indican que la capacidad de repoblación de las CMHs derivadas de hígado fetal de transgénicos SCL-NIC no está afectada, ni tampoco su capacidad de diferenciación.

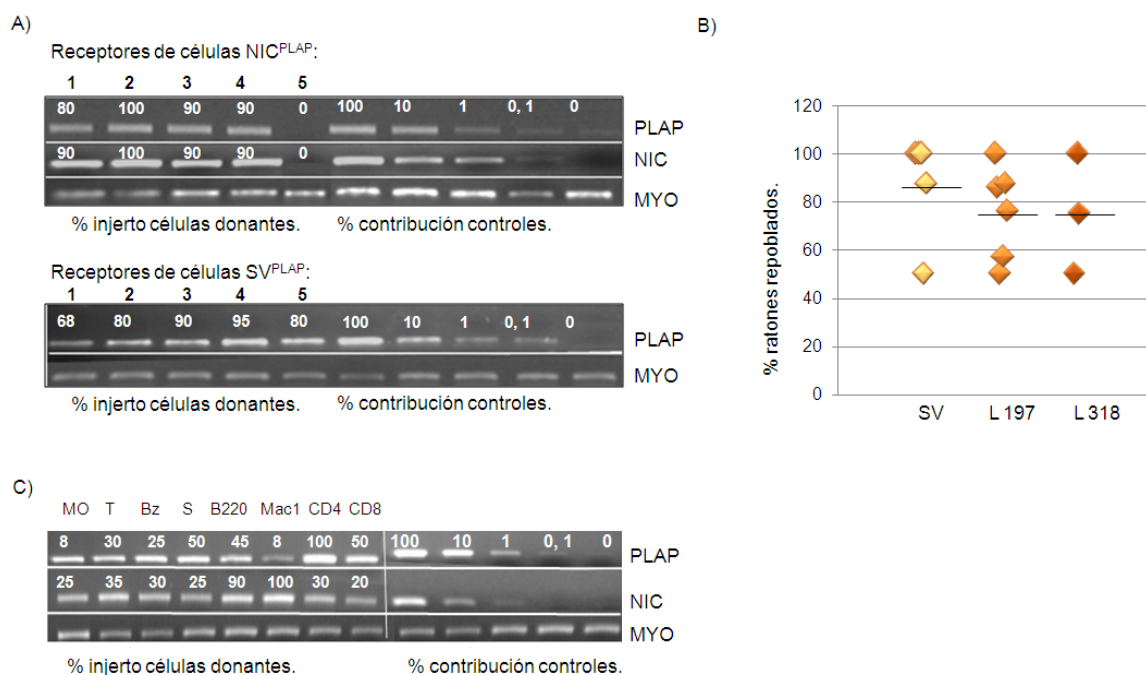
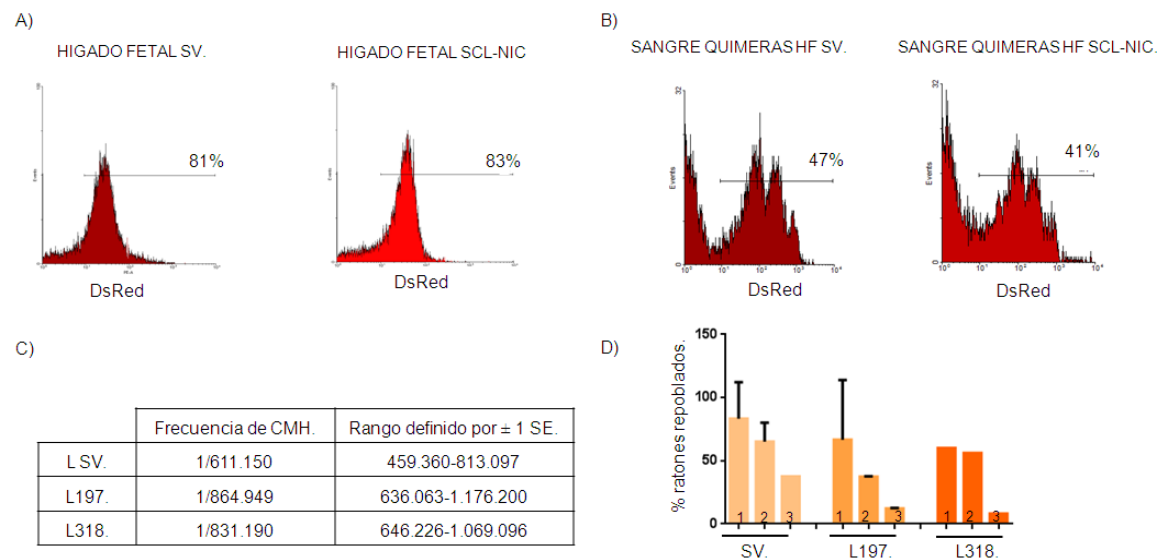


FIGURA 35. Análisis de repoblación a largo plazo en sangre periférica de animales trasplantados con células de hígado fetal E12 transgénicos para SCL-NIC. **A)** PCR representativa de muestras de gDNA de sangre periférica de 5 animales trasplantados con hígado fetal NIC^{PLAP} (superior) y controles SV^{PLAP} (inferior). La escala de diluciones control DNA transgénico/DNA silvestre se indica como 100%, 10%, 1%, 0,1% y 0%. El porcentaje de contribución de cada muestra se indica encima de cada línea. **B)** Frecuencia de repoblación de animales trasplantados con hígado fetal determinado mediante PCR. Cada rombo representa la media por experimento donde se analizan entre 3-5 animales. Se muestran los porcentajes de repoblación de los experimentos realizados para cada línea transgénica y para la silvestre. La línea horizontal muestra la media de repoblación de todos los experimentos realizados con cada línea transgénica. **C)** Determinación de la contribución de las células donantes a diferentes linajes celulares en médula ósea. Los diferentes linajes se aíslan mediante citometría de flujo y se cuantifica la expresión de PLAP y NCS mediante PCR semicuantitativa. Miogenina –Myo- se emplea como control endógeno. (MO, médula ósea; T, timo; Bz, bazo; S, sangre; B220, linfocitos B; Mac1, macrófagos; CD4 y CD8, linfocitos T).

Para determinar con mayor precisión el número de CMHs trasplantables que se encuentran en el hígado fetal de los ratones SCL-NIC, se realizaron trasplantes con diluciones seriadas, estimando el número de CMHs trasplantables mediante estadística de Poisson (Szilvassy, Humphries et al. 1990). En estos experimentos, se emplearon células donantes marcadas con el vector actina-DsRed. Los embriones empleados en el análisis procedían de cruces de ratones de las líneas SV^{DsRed} x SV^{DsRed} y NIC^{DsRed} x NIC^{DsRed} (Figura 36A). Al igual que en el apartado anterior, previo al trasplante, la cabeza y saco vitelino de cada embrión se analizaron para determinar la expresión de LacZ por tinción X-gal (transgén asociado a NIC), y DsRed por emisión de fluorescencia, confirmándose por PCR el genotipo de cada donante al día siguiente

del trasplante. Los animales receptores se inyectaron vía intravenosa con diferentes diluciones celulares, 1×10^6 , 5×10^5 , 2×10^5 células/receptor, (8-15 animales por dosis). A los cuatro meses post-trasplante, se determinó el número de animales negativos, y se aplicó el análisis estadístico de Poisson empleando el software L-Calc de Stem Cell Technologies (figura 36C). No se detectaron diferencias en la capacidad de repoblación entre las células transgénicas NIC^{DsRed} y las silvestres SV^{DsRed} (figura 36).



Así mismo, el porcentaje de contribución multilínea de las células donantes era similar en ambos tipos de quimeras, NIC^{DsRed} y SV^{DsRed}, (Figura 37). Además, los animales repoblados a largo plazo con células de hígado fetal SCL-NIC no presentaban tumores.

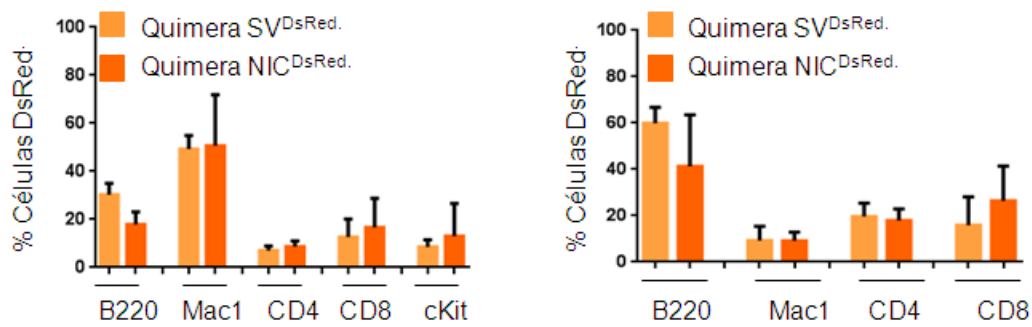


FIGURA 37. Repoblación multilínea en trasplantes de células de FL E12 SCL-NIC. Animales trasplantados con células de hígado fetal de las líneas NIC^{DsRed} y SV^{DsRed} se analizan a los 5 meses post trasplante determinando mediante FACS la contribución de las células donantes a los diferentes linajes en médula ósea (izquierda) y bazo (derecha). Se muestran histogramas representando la media de contribución a cada linaje celular considerando el nivel de DsRed en cada órgano como el 100%. No se observan diferencias significativas entre la contribución de células SV y NIC. Datos procedentes de 4 quimeras SV^{DsRed} y 5 quimeras NIC^{DsRed}. Análisis estadístico t de student.

3.3. Cotrasplantes de Progenitores lin⁻ c-Kit⁺ de Hígado Fetal E12.

Con el fin de determinar de forma más precisa el papel de la expresión de la forma activa de Notch1 en la repoblación de las CMHs de hígado fetal, se analizó el potencial de repoblación de progenitores lin⁻ c-kit⁺ SCL-NIC, enriquecida para CMHs, en ensayos de cotrasplante con células silvestres lin⁻ c-kit⁺.

Se establecieron los cruces necesarios para obtener células lin⁻ c-kit⁺ procedentes de donantes silvestres con el marcador Plap (c-Kit⁺ SV^{PLAP}), y transgénicos NIC^{DsRed} (c-Kit⁺ NIC^{DsRed}), y se transfirieron 10⁴ células de cada tipo por receptor. Cuatro meses después del trasplante, se determinó la frecuencia de animales repoblados con cada población y el porcentaje de células donantes en sangre periférica.

Como se muestra en la figura 37, los animales cotrasplantados con células lin⁻ c-kit⁺ derivadas de animales controles (c-kit-SV^{DsRed} y c-kit-SV^{PLAP}), presentaban una frecuencia similar de animales repoblados con células DsRed⁺ y PLAP⁺ (90% Dsred y 90%PLAP). Del mismo modo, los animales cotrasplantados con células lin⁻ c-kit⁺ derivadas de animales NIC (c-kit-NIC^{DsRed}), presentaban niveles similares de repoblación a los de las células control c-kit-SV^{PLAP}. Estos datos confirman que la

expresión de SCL-NIC en las CMHs fetales, no afecta a su capacidad de repoblación, al contrario de lo que ocurriría con las CMHs derivadas de médula ósea de adulto.

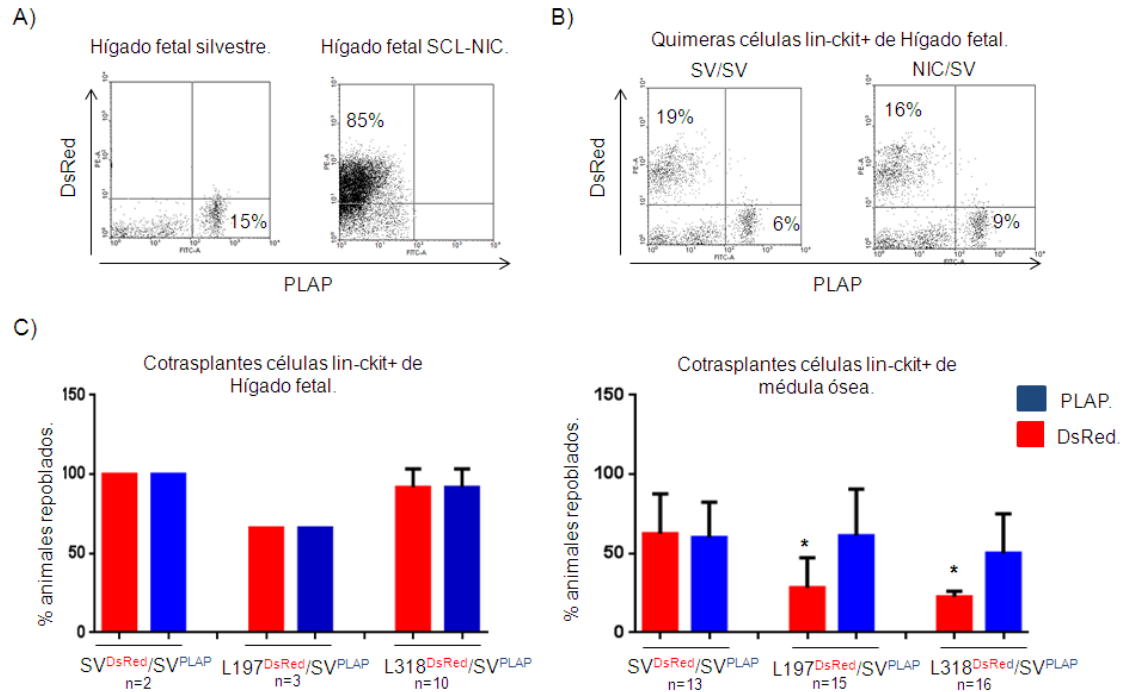


FIGURA 38. Cotrasplantes de progenitores lin- c-kit⁺ de Hígado Fetal E12. **A)** Expresión del marcador PLAP y DsRed en el hígado fetal de un ratón silvestre SV^{PLAP} y otro transgénico NIC^{DsRed}. **B)** Análisis de expresión de marcadores de células donantes en sangre periférica de quimeras SV^{DsRed}/SV^{PLAP} y NCS^{DsRed}/SV^{PLAP}. **C)** Determinación del porcentaje de animales repoblados en los ensayos de trasplante competitivo. Se representa la media de dos experimentos en el caso de trasplantes L318 NCS^{DsRed}/SV^{PLAP}. En el histograma de la derecha se muestran los obtenidos con médula ósea ya vistos en la figura 28.

3.4. Contribución Hematopoyética en las Quimeras de Hígado Fetal a Corto Plazo.

La expresión de SCL-NIC en células madre de adulto provoca, en ensayos de repoblación a corto plazo, un incremento de progenitores c-kit⁺, células T y mieloides derivados del donante en la médula ósea del receptor (Figura 31). Este fenómeno es consistente con la idea de que la activación de Notch induce una expansión inicial de progenitores c-kit⁺ y una aceleración de la diferenciación que incidiría en el

agotamiento de las CMHs y, como consecuencia, daría un menor número de animales injertados a largo plazo. La idea de que la activación de Notch induce la extinción de CMHs a largo plazo ha sido sugerida por otros autores recientemente (Chiang, Shestova et al. 2013). Considerando que la expresión de SCL-NIC en células fetales no induce una disminución de su capacidad de repoblación a largo plazo, se esperaría que, a corto plazo, la frecuencia de progenitores c-kit y linajes maduros derivados de donantes fetales NIC^{DsRed}, fuese similar a los controles trasplantados con células fetales SV^{DsRed}. Para determinar el comportamiento en diferenciación de las células fetales en trasplantes a corto plazo, se transfirieron 10⁶ células de hígado fetal por receptor, y se analizaron diferentes marcadores en la médula ósea de las quimeras a 30 los días post-trasplante: Mac1 (mieloides), B220 (linfocitos B), CD4 y CD8 (células T) y lin- c-kit+.

En el análisis de la médula ósea de las quimeras generadas con células de hígado fetal SCL-NIC, no se observaron diferencias con respecto a las quimeras control (figura 39). Así mismo, tampoco se observaron diferencias en la composición celular del bazo y el timo (Figura 40).Ç

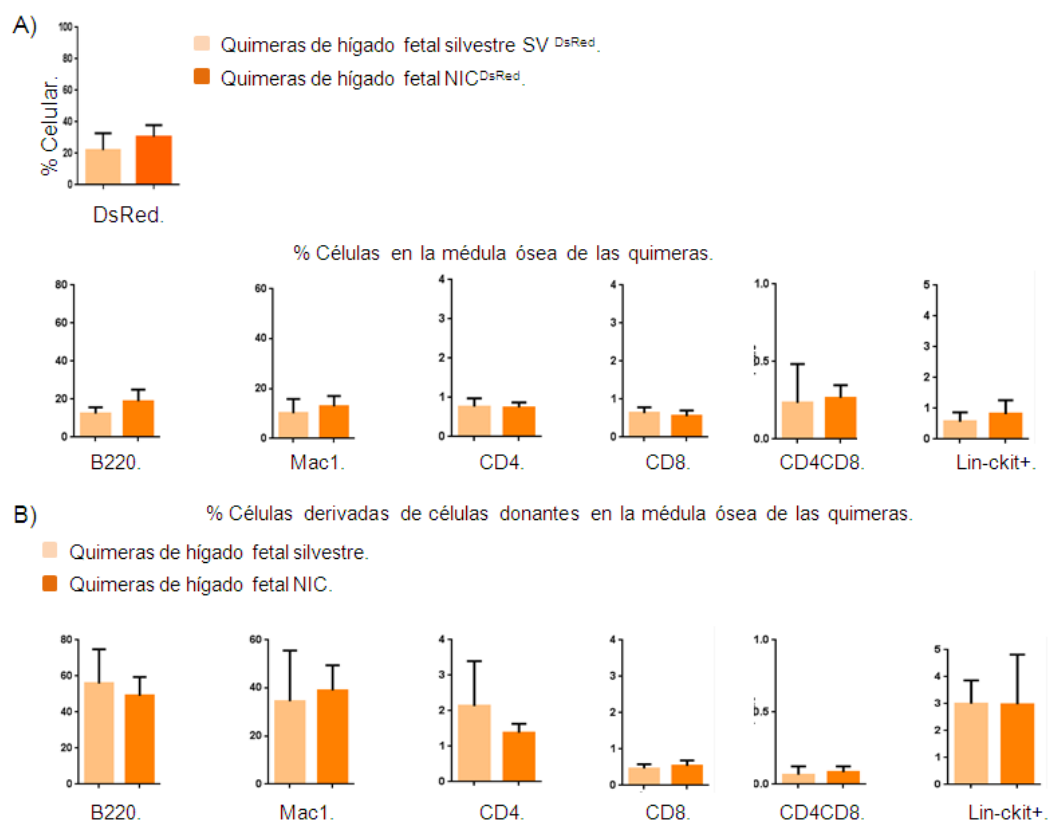


FIGURA 39. Análisis del injerto en médula ósea a corto plazo en las quimeras generadas con hígado fetal NIC^{DsRed} y SV^{DsRed}. El porcentaje para cada marcador de linaje y el marcador DsRed de células donantes se determina por citometría de flujo en la médula ósea de quimeras HF E12 a los 30 días post trasplante. **A)** Se muestra el porcentaje celular para los distintos marcadores en la médula ósea de las quimeras. **B)** Análisis por citometría de flujo del porcentaje de cada tipo celular derivado de las células donantes DsRed en la médula ósea de las quimeras. Se analizan un total de tres quimeras silvestres y seis quimeras transgénicas NIC. No se observan diferencias significativas (análisis t de student).

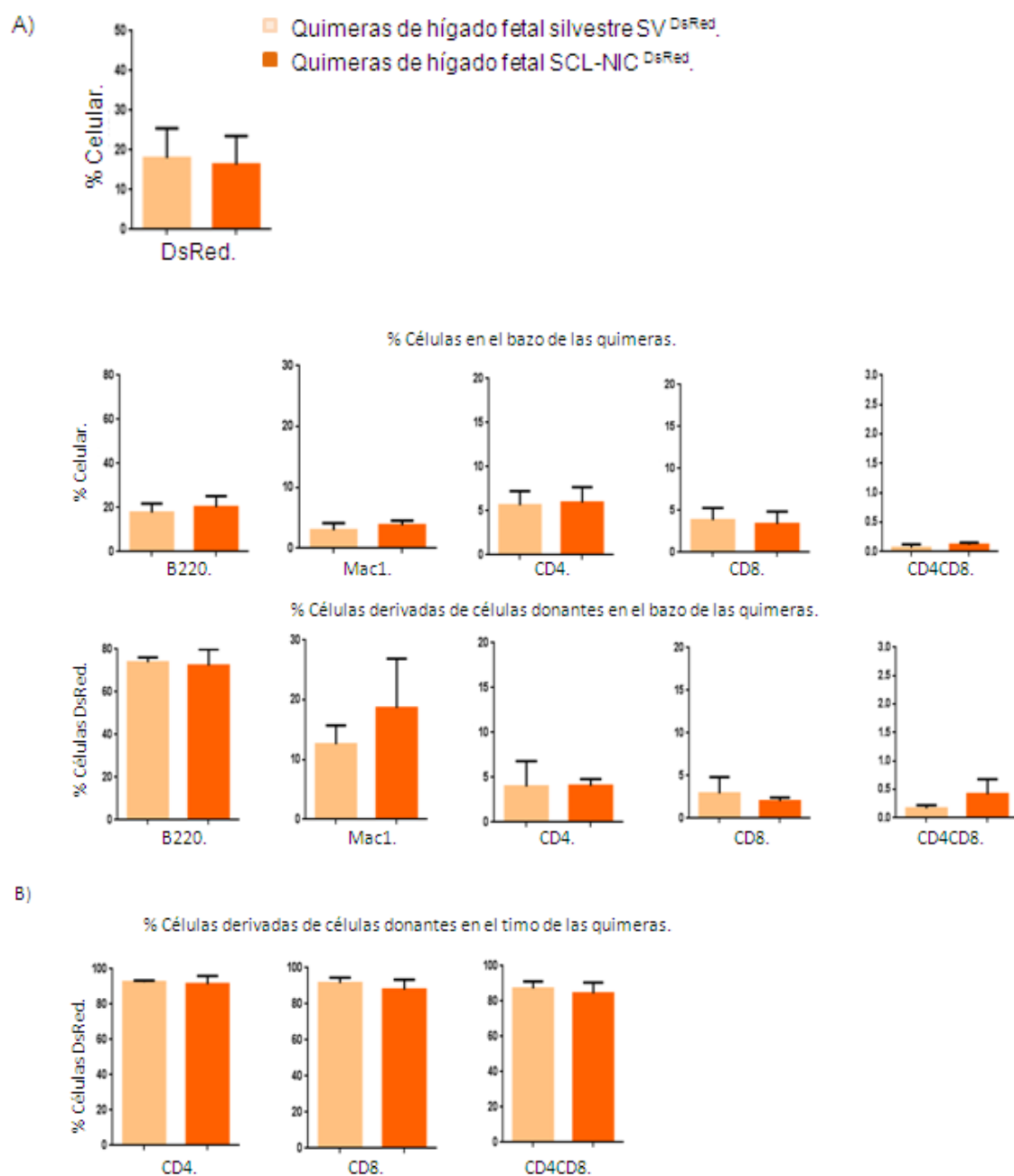


FIGURA 40. Análisis del injerto en bazo y timo a corto plazo en las quimeras generadas con hígado fetal NIC $DsRed$ y SV $DsRed$. **A)** En la parte superior se muestra el porcentaje celular para los distintos marcadores de linaje y DsRed en el bazo de las quimeras, en la inferior el porcentaje de cada tipo celular derivado de las células donantes DsRed. **B)** Análisis del porcentaje celular derivado de las células donantes en el timo. Se analizan un total de tres quimeras silvestres y seis quimeras transgénicas SCL-NIC. Análisis t de student con varianzas desiguales ($p < 0,05$).

3.5. Análisis de la Variación en los Niveles de Expresión de GATA2, Notch1 y Hes1 en Células Fetales SCL-NIC.

Para determinar si la expresión de la forma activa de Notch1, NIC, incide en los niveles de expresión de genes modulados directamente por Notch en las células de hígado fetal, se analizaron mediante qPCR, los niveles de expresión de transcritos para GATA2, Notch1 y Hes1 en el hígado fetal total. Los resultados mostraron que no había un incremento de expresión en los genes diana de Notch (Figura 41). Con el objetivo de determinar si este fenómeno era debido a una dilución de la población que realmente expresa el vector SCL-NIC, se sortearon las células lin- c-kit+. Tampoco se encontraron valores significativamente incrementados de transcritos para éstos genes en la población c-kit+ procedente de ratones SCL-NIC (Figura 41B).

Por tanto, a diferencia de las células madre adultas, las CMHs fetales son refractarias a la activación de Notch mediada por el vector de expresión SCL-NIC-3'Enh.

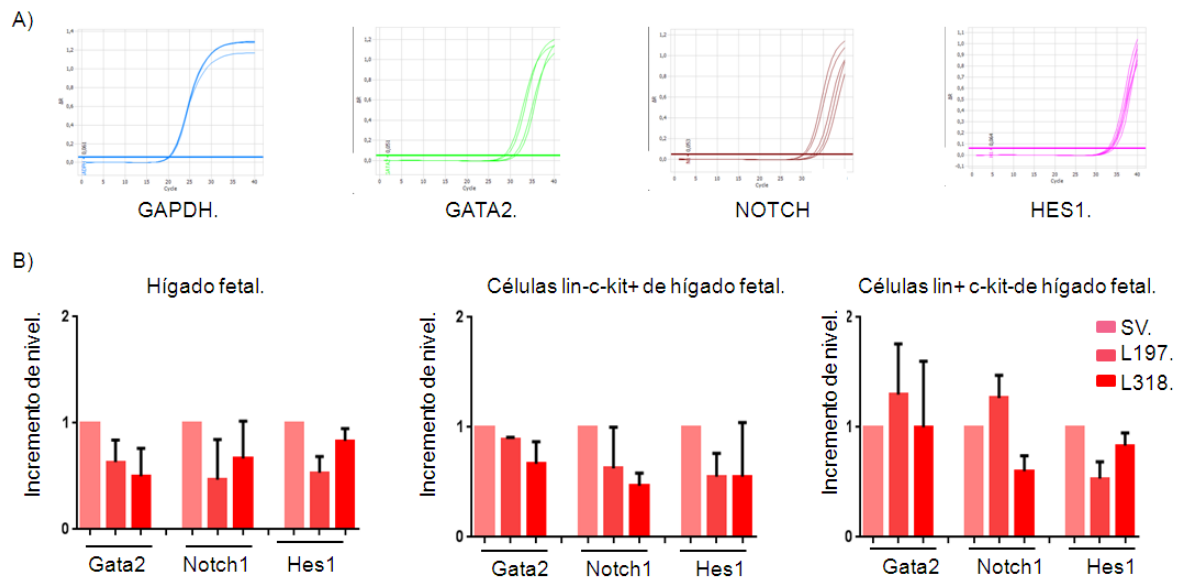


FIGURA 41. Cuantificación relativa de genes diana de Notch en células de hígado fetal por qPCR. **A)** Experimento representativo mostrando el ciclo umbral (Ct) para Gapdh, GATA2, Notch1 y Hes1. Experimento realizado en tres muestras cada una por duplicado. **B)** Histogramas representando el incremento de nivel relativo de transcritos indicados con respecto a células de animales control (SV). Los valores se estandarizan con respecto al gen control GAPDH. El tipo de célula empleado se indica encima de cada hitograma. Se representa la media de tres experimentos independientes.

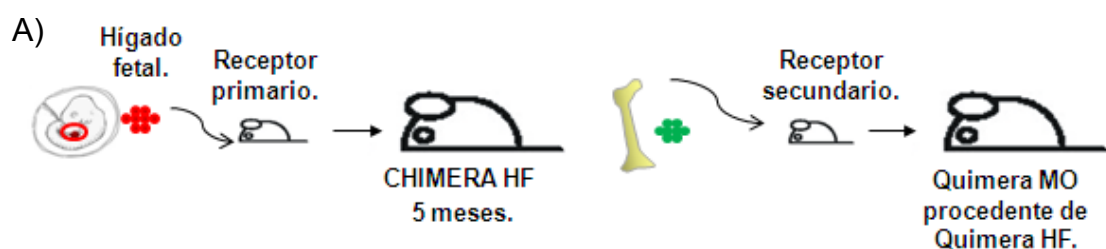
3.6. Trasplantes Secundarios de Células de Médula Ósea Derivadas de Quimeras de Hígado Fetal.

Si el efecto de SCL-NIC está relacionado con el estadio fetal de las células madre (mediado por factores epigenéticos, disponibilidad de cofactores de la ruta, entre otros), se esperaría que la progenie de CMHs, generadas a largo plazo en las quimeras de hígado fetal, se comportase como las células adultas de los transgénicos SCL-NIC en ensayos de repoblación hematopoyética. Para demostrar este punto, se realizaron trasplantes secundarios (Figura 42).

Cinco millones de células de médula ósea de receptores primarios trasplantados con células de hígado fetal NIC^{PLAP} o control SV^{PLAP}, fueron transferidas a receptores secundarios. Como donantes se seleccionaron receptores primarios NIC^{PLAP} y SV^{PLAP} con similar nivel de repoblación hematopoyética en la médula ósea (70-100%), y frecuencia de células lin-c-kit+ (1-4%). A los 4 meses post-trasplante, se determinó el porcentaje de animales repoblados en sangre periférica. Los animales trasplantados

con células de médula ósea de quimeras de hígado fetal silvestre, presentaban un porcentaje de animales repoblados del 65%, mientras que el porcentaje de animales repoblados con médula ósea de quimeras de hígado fetal SCL-NIC, apenas alcanzaron un 10% (Figura 43).

Por tanto, la reprogramación de células fetales a células adultas también incluye el cambio funcional de respuesta a la activación de Notch: las CMHs NIC⁺ de origen fetal pierden la capacidad de repoblación con el tiempo. Más estudios son necesarios para determinar si este cambio de respuesta está mediado por cambios epigenéticos que modulan regulación génica o cambios de disponibilidad de cofactores de la ruta de Notch producidos durante el paso de CMH fetal a adulta.



B)

Receptor primario.	%PLAP PCR Médula ósea.
Quimera HF SV 1.	77
Quimera HF SV 2.	100
Quimera HF SV 3.	70

Receptor primario.	%PLAP PCR Médula ósea.	%NCS PCR Médula ósea.
Quimera HF TG 1.	100	100
Quimera HF TG 2.	100	100
Quimera HF TG 3.	10	10
Quimera HF TG 4.	100	10
Quimera HF TG 5.	18	76

C)

Receptor primario.	%ckit en Médula ósea.
Quimera HF SV 1.	1
Quimera HF SV 2.	3
Quimera HF SV 3.	4

Receptor primario.	%ckit en Médula ósea.
Quimera HF TG 1.	2
Quimera HF TG 2.	1
Quimera HF TG 3.	1,4
Quimera HF TG 4.	4
Quimera HF TG 5.	2

FIGURA 42. Caracterización de receptores primarios, quimeras de hígado fetal. **A)** Esquema de trasplante secundario. Médula ósea procedente de quimeras de hígado fetal se emplea en nuevos experimentos de trasplante. **B)** Valores de quimerismo obtenidos de PCR-PLAP y PCR-NIC semicuantitativa en la médula ósea de los receptores primarios de hígado fetal silvestre y transgénico. **C)** Porcentaje de c-kit⁺ en médula ósea de receptores primarios de hígado fetal silvestre y transgénico determinados por citometría de flujo.

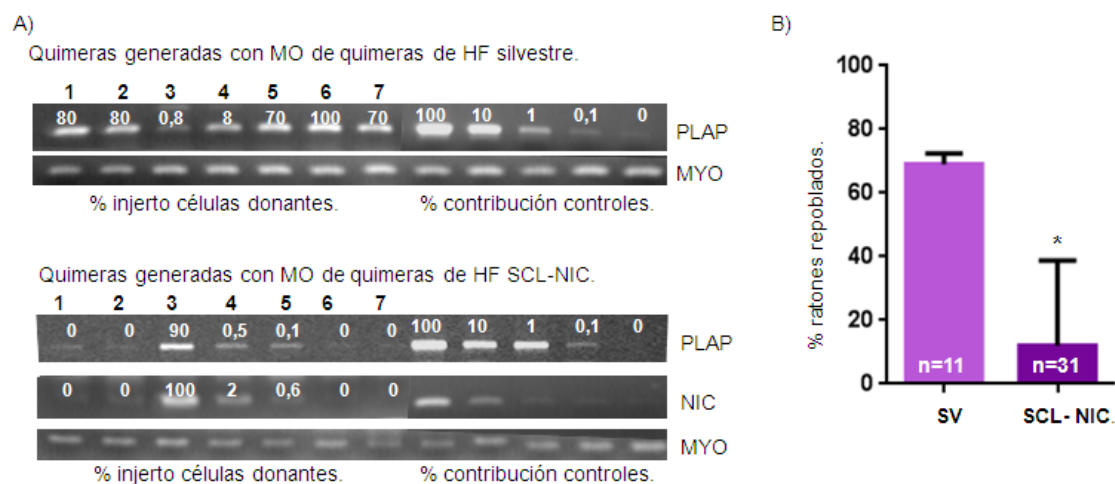


FIGURA 43. Repoblación a largo plazo en trasplantes secundarios. Receptores secundarios son trasplantados con células de médula ósea derivada de quimeras de hígado fetal SV^{PLAP} e hígado fetal NIC^{PLAP}. Los receptores secundarios se analizan a los 5 meses post trasplante. **A)** Determinación por PCR-NIC y PCR-PLAP semicuantitativa del nivel de injerto obtenido en receptores secundarios. Se representa un experimento tipo con 7 individuos analizados. El nivel de repoblación se representa en la parte superior de las bandas junto con la escala de diluciones límites del gen PLAP y NIC. **B)** Frecuencia de ratones repoblados (>1% señal donante) en trasplante secundario con médula ósea de receptor primario control, SV^{PLAP} y NIC^{PLAP}. Análisis estadístico t de student para varianzas desiguales.

Si la reprogramación es completa, se esperaría que las células de médula ósea de los receptores primarios de hígado fetal, respondan a la activación de Notch incrementando los niveles de expresión de los genes diana. Para demostrar este punto, se aislaron células c-kit+DsRed+ de médula ósea de los receptores primarios por citometría de flujo y, mediante qPCR, se determinó el nivel de expresión de los genes diana de Notch (Figura 44). Como se puede observar, las células de médula ósea de las quimeras generadas con hígado fetal transgénico NIC, presentan niveles de expresión de genes diana superiores a los de las quimeras generadas con hígado fetal silvestre.

Células c-kit⁺ DsRed⁺ de médula ósea de quimeras generadas con hígado fetal.

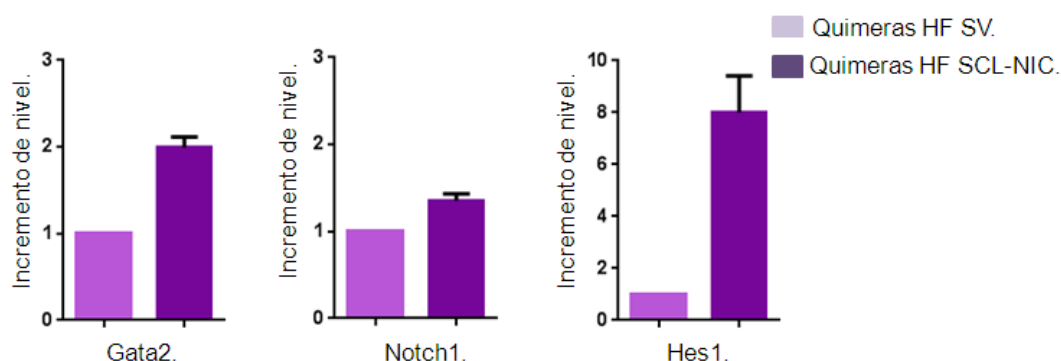


FIGURA 44. Análisis qPCR de células c-kit⁺DsRed⁺ procedentes de médula ósea de quimeras hígado fetal silvestre y transgénico SCL-NIC para los genes diana de Notch: GATA2, Notch1 y Hes1. Análisis realizado a los 4 meses post trasplante. Se muestra la media de dos experimentos realizados.

4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA DE NEONATOS EN TRANSGÉNICOS SCL-NIC.

4.1. Cotrasplantes de Progenitores lin-c-kit⁺ de Médula Ósea de Neonatos.

Las células madre del hígado fetal dan lugar a células madre que, durante el desarrollo, migran a la médula ósea del recién nacido. Independientemente de su localización, las células madre del neonato siguen manteniendo características fetales en relación a su capacidad proliferativa, alta tasa de repoblación en trasplantes, y preferencia por la diferenciación mieloide versus linfoide. Se ha determinado que, a partir de la tercera semana post-trasplante, las características fetales desaparecen y pasan a ser CMHs de fenotipo adulto (Bowie, Kent et al. 2007).

Con el objetivo de estudiar si la respuesta al incremento de función de Notch1 en CMHs de recién nacido sigue una pauta similar a la fetal, se realizaron ensayos de cotrasplante y repoblación a largo plazo con CHMs de médula ósea lin⁻ c-kit⁺ de ratones neonatos NIC^{DsRed} y SV^{PLAP}. Un total de doce animales se trasplantaron con 10⁴ células lin-cKit⁺SV^{PLAP} junto con 10⁴ células lin- c-kit⁺NIC^{DsRed} por receptor. De los doce animales trasplantados, ocho presentaron repoblación en sangre periférica, tanto de células silvestres como células SCL-NIC (Figura 45). Estos datos indican que las células c-kit⁺ de médula ósea de recién nacido, tienen un comportamiento similar a las

células de hígado fetal, y son refractarias al bloqueo de la capacidad de repoblación mediado por la activación de Notch1. Estos datos apoyan la idea de que el efecto de la activación de Notch1 en CMHs está determinado por el estadio del desarrollo.

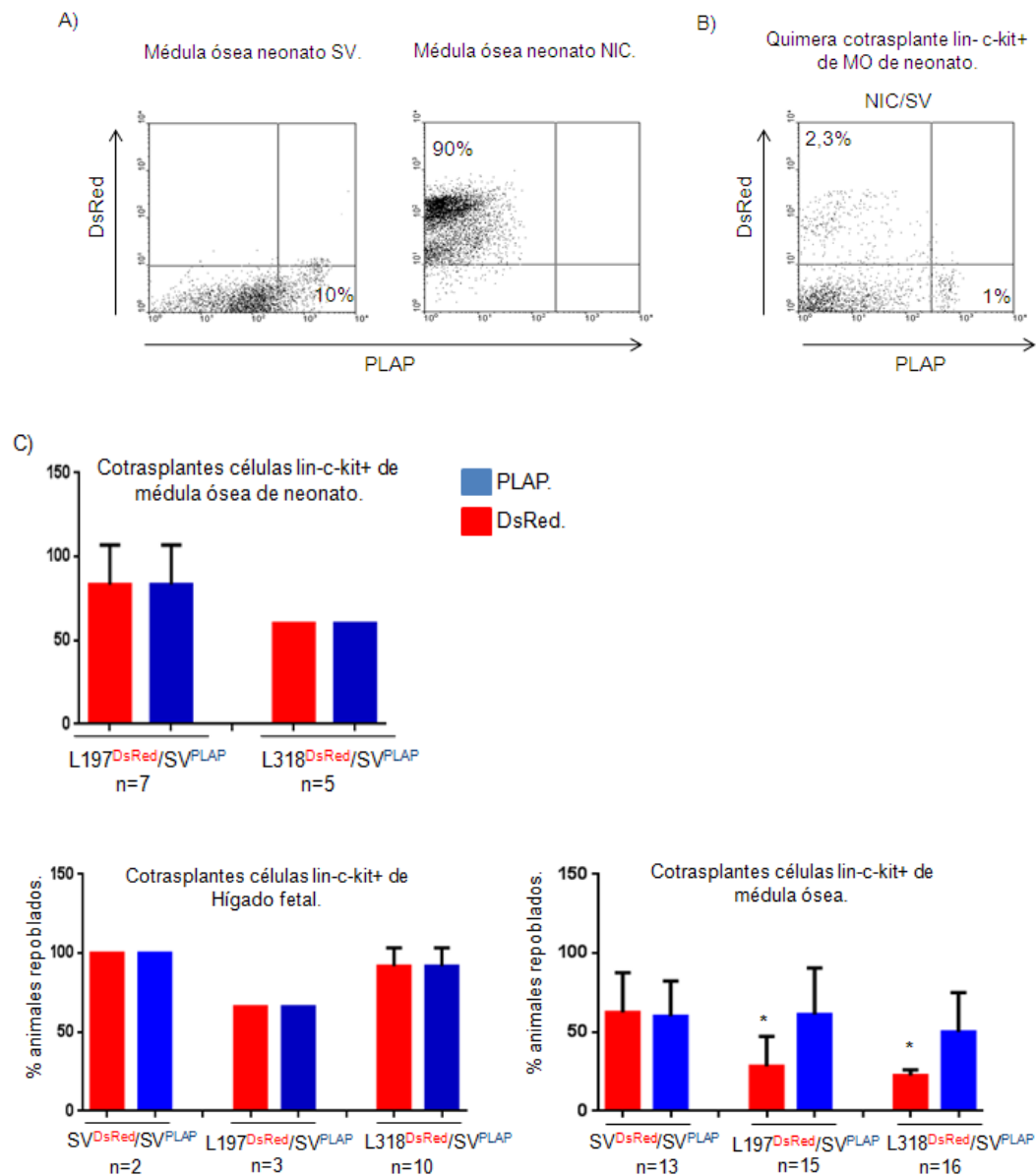


FIGURA 45. Repoblación de células lin- c-kit+ de médula ósea de neonato en ensayos de cotrasplante. A) Expresión del marcador PLAP en médula ósea de neonato de un ratón silvestre y expresión de DsRed en la médula ósea de un animal neonato transgénico SCL-NIC determinados mediante citometría de flujo. B) Análisis del injerto en sangre periférica de los animales trasplantados con células médula ósea de neonato silvestre (PLAP) y transgénica (DsRed) en ensayos de cotrasplante mediante citometría de flujo. C) Determinación del porcentaje de repoblación obtenido en los ensayos de trasplante competitivo de células de médula ósea de neonato. Bajo los datos obtenidos en los experimentos médula ósea de neonato se muestran los obtenidos con hígado fetal y médula ósea ya vistos en las figuras 29 y 38. Análisis estadístico t de student.

4.2. Análisis de la Variación en los Niveles de Expresión de GATA2, Notch1 y Hes1 en Células de Médula Ósea de Recién Nacido.

Si las células lin⁻ c-kit⁺ de recién nacido son refractarias al incremento de función de Notch1, cabría esperar que la regulación de genes diana de la ruta de Notch no estuviese afectada, de forma similar a lo que se ha observado en las células de hígado fetal. Para determinar este punto, se purificaron las células lin⁻c-kit⁺ de médula ósea de recién nacido, y se determinaron por qPCR los niveles de Notch1, Hes1 y GATA2, comparados con las células silvestres. Como puede observarse en la figura 46, no se produce un incremento en los valores de dichos genes, al igual que sucedía en el hígado fetal. Estos datos confirman que las células de características fetales son refractarias a la activación de Notch mediada por NIC.

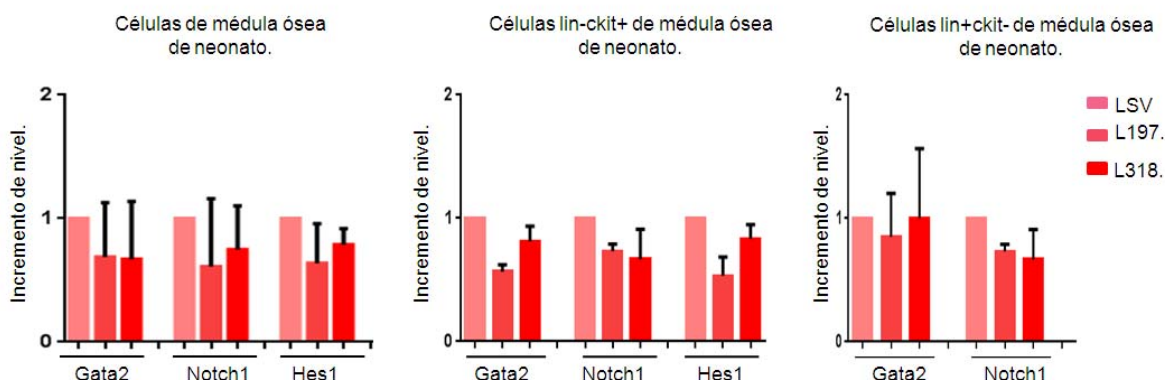


FIGURA 46. Determinación de la expresión de genes en médula ósea total de neonato y en las poblaciones sorteadas lin⁻c-kit⁺ y lin⁺ c-kit⁻ determinados mediante PCR a tiempo real. Se muestra la media de tres experimentos excepto en el caso de Hes1 para las células sorteadas donde se repitió una vez en cada línea transgénica.

4.3. Análisis de los niveles de expresión de SCL-NIC en Progenitores lin⁻ c-kit⁺ de Médula Ósea de Adulto, Neonatal y de Hígado Fetal.

Al comportarse las CMHs fetales de forma diferente a las adultas, cabe la posibilidad de que la expresión de SCL-NIC sea diferente en cada tipo celular. Para comprobar los niveles de expresión del transgén en el hígado fetal, y en la médula ósea de neonato y de adulto, se sortearon las células lin⁻c-kit⁺ de los ratones transgénicos

SCL-NIC, se aisló el cDNA, y se cuantificó la expresión del transgén mediante PCR semicuantitativa y el software GelPro Analyzer (no se encontraron oligonucleótidos óptimos para la cuantificación por qPCR). Los resultados muestran que SCL-NIC se expresa en todos los grupos de células estudiados con valores similares (figura 47).

Por tanto, no se cree que las diferencias encontradas entre las CMHs fetales y adultas se deba a una desigual expresión del transgen.

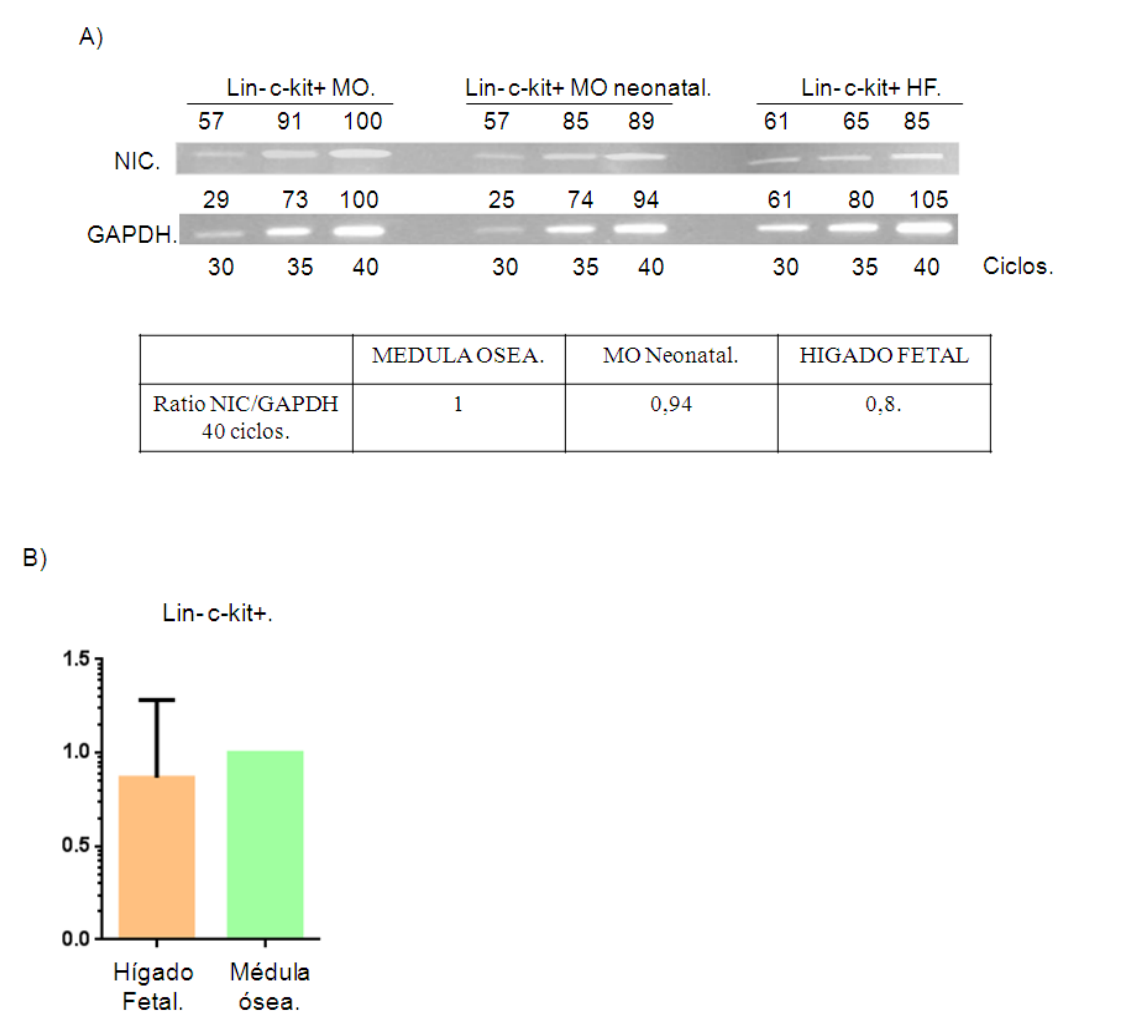


FIGURA 47. PCR semicuantitativa en cDNA de células lin-c-kit+ procedentes de médula ósea de adulto médula ósea de neonato e hígado fetal E12 de ratones transgénicos SCL-NIC. A) Se realiza la PCR a diferentes ciclos para comprobar que el sistema no se encuentra saturado. La intensidad de las bandas se cuantifica con el software GelPro y los valores se corrigen con respecto al gen endógeno Gapdh. En la tabla inferior se muestran los valores de expresión de NIC a 40 ciclos tras la corrección con el gen endógeno. B) Mediante PCR a tiempo real se determinan los niveles de Notch1 en la población lin- c-kit+ del hígado fetal y de la médula ósea de los ratones silvestres.

CAPITULO 2. EFECTO DE LA FALTA DE FUNCIÓN DE NOTCH1 EN CÉLULAS FETALES

1. GENERACIÓN DEL KNOCK-OUT CONDICIONAL DE NOTCH1 EN PROGENITORES Y CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS FETALES MEDIANTE EL SISTEMA DE RECOMBINACIÓN CRE-LOXP INDUCIDO POR TAMOXIFENO.

La delección de Notch1 en ratón resulta letal durante la embriogénesis temprana, en el estadio E9-10, previo a la formación de células madre hematopoyéticas definitivas generadas en la zona AGM, (Kumano, Chiba et al. 2003). Por tanto, para estudiar el papel de Notch1 en células madre y progenitores de hígado fetal en estadios posteriores del desarrollo, es necesario realizar delecciones condicionales. Para ello, se ha empleado el sistema de la recombinasa Cre inducido por tamoxifeno usando los ratones Notch1lox (Notch1^{ff}) (Radtke, Wilson et al. 1999) , y SCL-Cre-ER^T, que porta la proteína Cre fusionada al receptor de estrógeno mutado que responde al tamoxifeno (TM) (Gothert, Gustin et al. 2005), y su expresión está regulada por el 3'Enh del gen SCL. Para monitorizar la recombinación mediada por Cre, los ratones Notch1^{ff} se cruzan con los ratones R26R-loxSTOPlox-EYFP (R26R-EYFP), donde el gen EYFP se expresa si hay recombinación (Srinivas, Watanabe et al. 2001).

1.2. El Sistema de Recombinación CreLoxP.

Este sistema consiste en introducir una variación en la secuencia de DNA elegida empleando la recombinasa Cre, que recombina un par de secuencias diana llamadas secuencias LoxP, derivadas del bacteriófago P1 y constituidas por 34 pares de bases. Los sitios LoxP se localizan, por ingeniería molecular, flanqueando la secuencia a deleccionar. Cre-ER^T es una proteína de fusión de Cre con el receptor de estrógeno modificado de forma que no puede unirse al ligando natural, el β -estradiol (Indra, Warot et al. 1999). Sólo se une al ligando sintético hidroxitamoxifeno (derivado metabólico del tamoxifeno). En ausencia de tamoxifeno, Cre^T se localiza en el citoplasma y está inactivo, pero cuando se administra el tamoxifeno, se une al receptor

de estrógeno modificado (ER), lo que permite la traslocación de Cre-ER^T al núcleo, donde ejerce su función de recombinasa del DNA flanqueado por sitios lox (Chow, Tian et al. 2006) (figura 48).

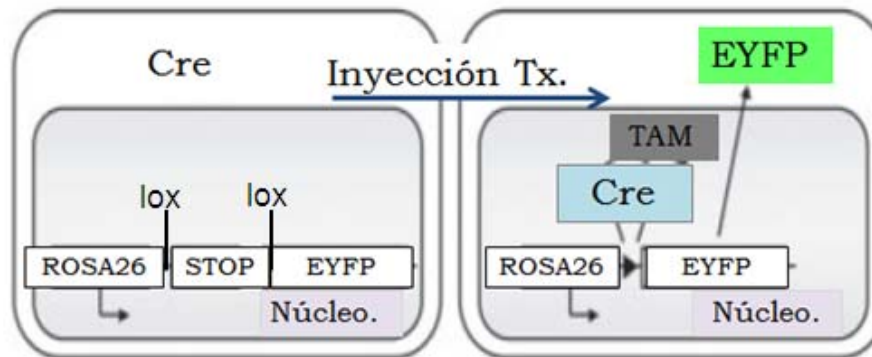


FIGURA 48. Función del sistema Cre-LoxP. Tras la inyección del tamoxifeno, la Cre^T se dirige al núcleo celular donde corta la secuencia de STOP permitiendo la expresión de la proteína amarillo fluorescente (EYFP).

1.3. Funcionalidad de los Ratones SCL-Cre-ER^T. Pautas de Administración del Tamoxifeno y Eficiencia de Recombinación

Para obtener el mayor porcentaje de células madre definitivas c-kit⁺ con recombinación eficiente, se ensayaron diversas dosis de tamoxifeno en cruces de ratones control SCL-CreER^T x R26R-EYFP^{ff}, y se analizó el genotipo y el porcentaje de células en hígado fetal c-kit⁺YFP⁺ por FACS (Figura 49A). Como el tamoxifeno tiene cierto grado de toxicidad durante la gestación (Jordan 1984; Diwan, Anderson et al. 1997), también se determinaron con detalle las alteraciones morfológicas (figura 49B). Se ensayaron tres pautas de administración de tamoxifeno por vía intraperitoneal:

Dosis 1: E7-2mg, E8-2 mg, E9-2mg, análisis E12;

Dosis 2: E9-2mg, E10-2 mg, E11-2mg, análisis E12;

Dosis 3: E10-2mg, E11-2 mg, análisis E14.

En la dosis 1, se obtuvo una alta mortalidad (27%), y un bajo porcentaje de recombinación en células madre (1,1% de células c-kit⁺YFP⁺). Con la Dosis 2 la

mortalidad es casi nula, pero el porcentaje de recombinación en CHMs sigue siendo bajo (0.8% de células c-kit+YFP+). Con la Dosis 3, se consigue incrementar el porcentaje de CMHs que presentan recombinación (2.5% de células c-kit+YFP+), con una media total de células YFP+ del 11% (rango 5-20%) (figura 49C). Por lo tanto, para los siguientes protocolos experimentales se escogió la dosis de tamoxifeno de E10-2mg, E11-2mg, y análisis E14.

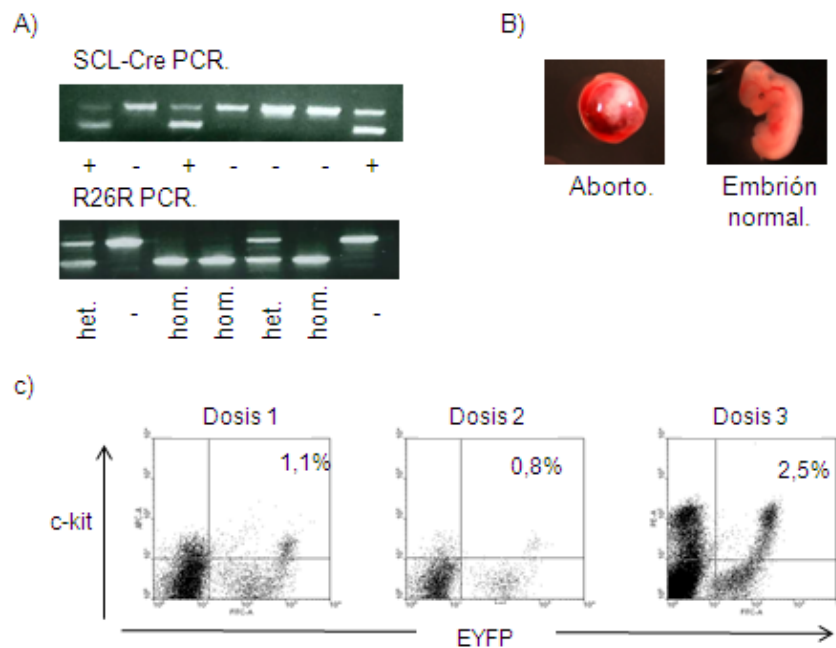


FIGURA 49. Funcionalidad de los Ratones SCL-Cre-ER^T;R26R-EYFP. **A)** Genotipado de ratones SCL-Cre-ER^T;R26R-EYFP. Determinación del genotipo mediante PCR en gel de agarosa. En la PCR SCL-Cre la banda superior es indicativa de la presencia de DNA en la muestra, la banda inferior es específica para Cre. **B)** Se muestran un ejemplo de aborto y de un embrión normal procedentes de los cruces SCL-Cre-ER^T;R26R-EYFP tras la inyección de tamoxifeno. **C)** Expresión de YFP para cada dosis de tamoxifeno empleada. Dot-plots representativos mostrando la expresión de YFP en las células c-kit⁺ de hígado fetal con las dosis de inyección 1, 2 (E12) y 3(E14).

Para analizar el fenotipo de las células que expresan YFP en embriones SCL-CreER^T;R26R-EYFP^{ff}, se establecieron los cruces pertinentes. Después de la administración de tamoxifeno en estadio E10 y E11, se determinó en el hígado fetal de fetos E14 que un 6% de las células expresaban YFP, de las cuales el 3% eran c-kit⁺ (Figura 50). Las células madre y progenitores mieloides, también expresan el marcador Mac1, por lo que una fracción de células Mac1⁺ expresa YFP. Como el vector SCL3'Enh no se expresa en células eritroides Ter119⁺ (Sanchez, Gottgens et

al. 1999), se consideró que la fracción de células $\text{YFP}^+ \text{Ter119}^+$ procede de la diferenciación de células $\text{c-kit}^+ \text{YFP}^+$. Estos datos confirman la acción de la recombinasa Cre en progenitores hematopoyéticos.

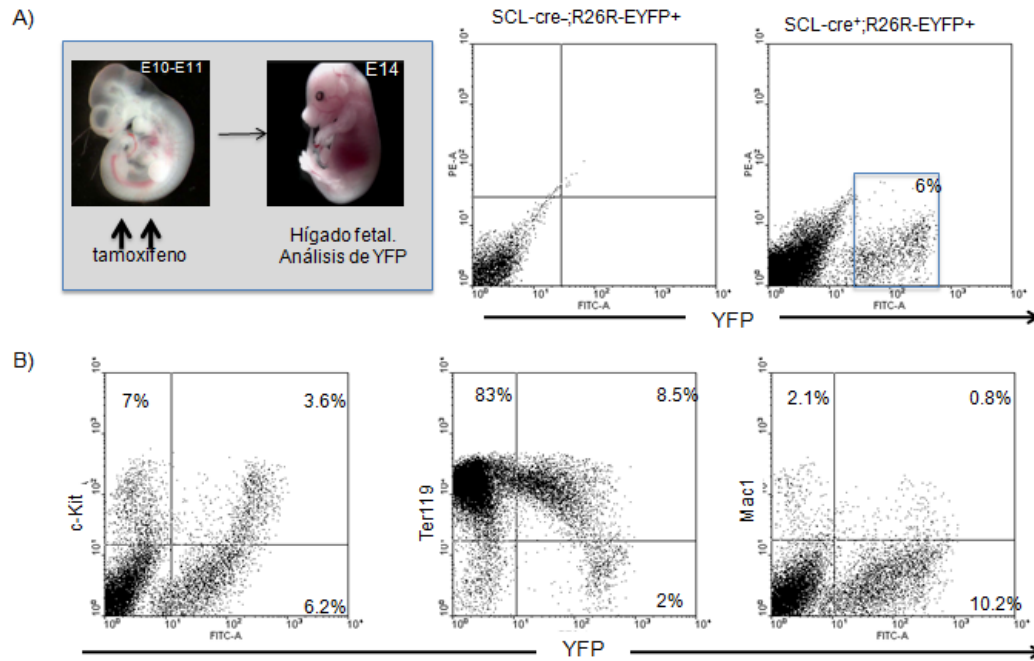


FIGURA 50. Expresión de YFP tras el tratamiento con 2mg/día de tamoxifeno. **A)** El tamoxifeno se inyecta a día E10-11 y se analiza el hígado fetal a E14. FACS plot en HF E14 tratados con tamoxifeno de animales $\text{SCL-Cre}^T; \text{R26R-EYFP}$ negativo (izquierda) y positivo para SCL-Cre^T ; **B)** Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de c-kit, Ter119 y Mac1 en el hígado fetal de los embriones $\text{SCL-Cre}; \text{R26R-EYFP}$ a día 14 de desarrollo.

2. ANÁLISIS DE RATONES SCL-CRE-ER^T, R26R-EYFP;^{ff}NOTCH1^{ff}

2.1. Obtención de Ratones SCL-Cre-ER^T;R26R-EYFP^{f/+};Notch1^{+/+}, y SCL-Cre-ER^T R26R-EYFP^{f/+};Notch1^{ff} y Estrategia de Genotipado.

Para aclarar el criterio de genotipado antes y después del tratamiento con tamoxifeno denominamos a los animales como Notch1^{+/+}, silvestre; Notch1^{f/+}, heterocigótico para locus Notch1lox; Notch1^{ff}, homocigótico para locus Notch1lox; Notch1^{-/+}, heterocigótico mutante tratado con tamoxifeno (Tx); Notch1^{-/-} homocigótico mutante tratado con Tx. En el caso del locus R26R, se denomina R26R-EYFP^{+/+} silvestre; R26R-EYFP^{f/+}, heterocigótico tratado o sin tratar con Tx; R26R-EYFP^{ff} homocigótico tratado o sin tratar con Tx.

Mediante el cruce de los ratones SCL-Cre-ER^T;R26R-EYFP^{f/+} con los ratones Notch1^{f/f} y Notch1^{f/+}, se obtuvieron ratones SCL-Cre-ER^T;R26R-EYFP^{f/+};Notch1^{f/+}. Se buscó la homocigosis también para Notch1, de manera que éstos últimos ratones se cruzaron entre sí hasta obtener el ratón SCL-Cre-ER^T;R26R-EYFP^{ff};Notch1^{ff}, que es el ratón empleado para la delección de Notch1 en células de hígado fetal (figura 51).

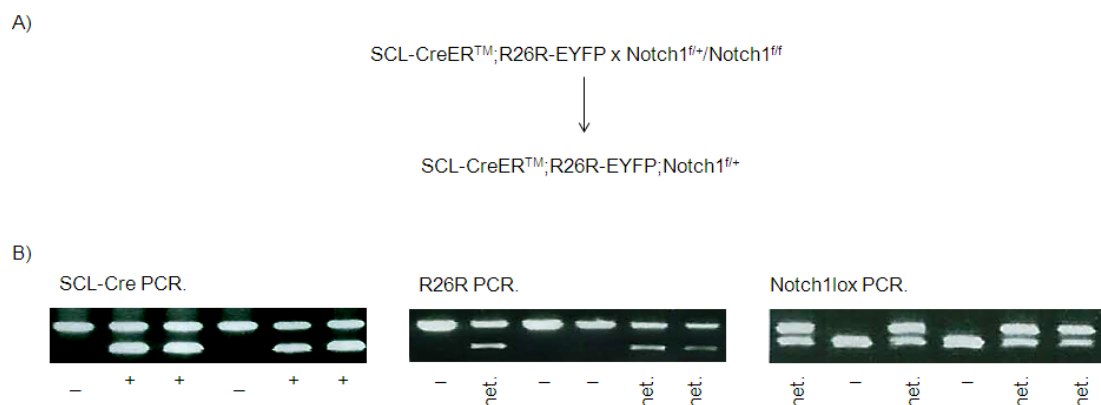


FIGURA 51. Ratones SCL-Cre-ER^T;R26R-EYFP^{ff};Notch1^{ff}. **A)** Esquema de cruce para obtener los ratones SCL-Cre^T;R26R-EYFP;Notch1lox^{ff}. **B)** Genotipado de los ratones mediante PCR en DNA obtenido a partir de tejido de oreja.

La recombinación en el locus Notch1 puede detectarse por PCR empleando oligonucleótidos específicos, que amplifican la banda que denominamos Delete, y que

se obtiene tras la recombinación (Wang, Leow et al. 2006) (figura 52). Hay que tener en cuenta que la acción de Cre delecciona una parte del gen Notch1 donde están diseñados los oligonucleótidos para la detección del genotipo Notch1lox (Jakson lab home page). La banda Delete (Del), sólo se amplifica en animales N1lox^{f/+} o N1lox^{f/f} que tienen el gen SCL-Cre, y que han sido tratados con Tamoxifeno (Figura 51B). Como la acción de SCL-Cre está restringida a progenitores, en la gran mayoría de las células no se espera ver recombinación del alelo mutante, por ello, en PCR del hígado fetal aparecen la banda mutante y la silvestre.

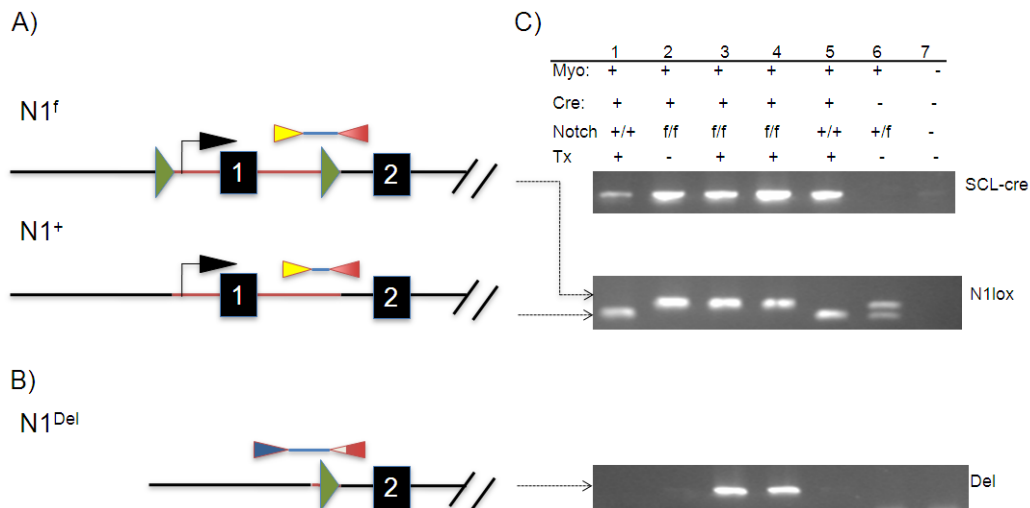


FIGURA 52. Tipaje de embriones procedentes de cruces de ratones SCL-Cre;N1^{f/+}, tratados y no tratados con tamoxifeno. El tipaje se realiza en DNA extraído a partir de hígado fetal. En la tabla se representa el genotipado para myo (control endógeno de la presencia de DNA), Cre y Notch y se indica si están tratados con Tamoxifeno (Tx) o no. **A)** Posición de los oligonucleótidos para el genotipado de los ratones Notch1^{f/+}. En la parte superior se muestra la posición en 5' respecto al primer exón del gen Notch1 en un alelo floxeado loxP, y en la parte inferior se muestra su posición en un alelo silvestre. **B)** Posición de los oligonucleótidos Delete para detectar la recombinación producida tras la acción de Cre en un alelo floxeado loxP de Notch1. Mediante cuadros negros se muestra la posición de los exones en el gen Notch1, los triángulos verdes muestran la posición de las secuencias loxP. Cada oligonucleótido se representa por un triángulo coloreado: N1lox sentido/N1lox antisentido (amarillo y naranja respectivamente). El tamaño de banda PCR mutante es 280bp, banda SV 200 pb; Del sentido/Del antisentido (azul y blanco-naranja, respectivamente). El tamaño de la banda PCR es de 400 pb. El oligonucleótido 3'de delete se representa en dos colores indicando que parte de la secuencia es compartida con el oligonucleótido N1loxantisentido. C) Se representa el genotipo de siete embriones para Myo, Cre, y Notch y las bandas de geles de PCR. En los embriones SCL-Cre;Notch^{f/f} donde se ha inyectado tamoxifeno se observa banda de PCR Delete, no siendo así en los demás casos.

2.2. Eficiencia de Recombinación del Locus Notch1^{ff} tras la Inyección de Tamoxifeno.

Para comprobar la eficiencia y la especificidad de la recombinación en el locus N1 en las células que expresan el SCL-Cre, se cruzaron ratones SCL-CreER^T;Notch1^{ff};R26R-EYFP^{ff} y, después del tratamiento con Tamoxifeno (Tx) de las madres gestantes, se obtuvieron células YFP+ y YFP- del hígado fetal. Seguidamente, se realizó un análisis por PCR del gDNA para N1lox, miogenina (Myo) y Delete. Si se ha producido recombinación total, se esperaría desaparición de la banda N1lox y aparición de banda Delete. La medición de la densidad de la banda N1lox con respecto al control endógeno Myo, nos da una idea aproximada de la eficiencia de recombinación comparada con la banda producida en animales Notch1^{ff} no tratados con Tx (figura 53). De los tres embriones analizados se comprueba que, en las células YFP+, la recombinación en el locus N1^{ff} es completa en dos de ellos, y en el tercer embrión es parcial (70% aproximadamente). En las células YFP-, en cambio, no se observa expresión de Delete.

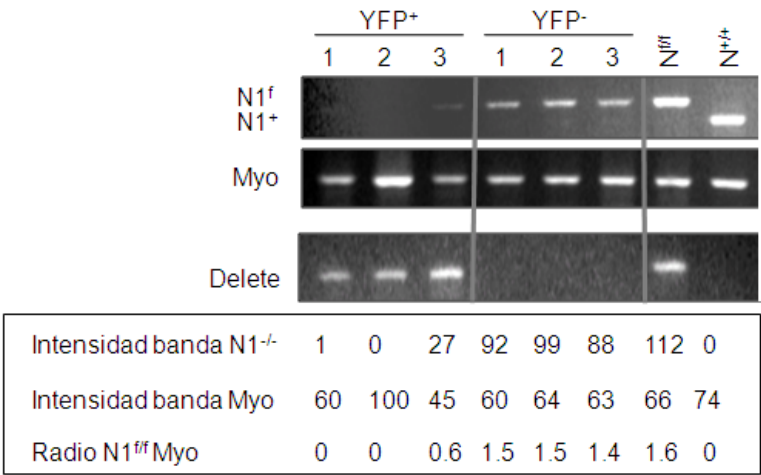


FIGURA 53. Eficiencia de recombinación del locus Notch1 en células de hígado fetal E14. Se sortean las células YFP+ y YFP- a partir de tres hígados fetales E14 SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch1^{-/-} y se extrae el DNA genómico a partir de las mismas. Se iguala su concentración a 10 ng/μl y se realiza PCR de Notch1lox para comprobar la desaparición del alelo floxeado como aproximación para conocer la eficiencia de la Cre recombinasa en el alelo. En la tabla inferior se muestran los valores de cuantificación de cada banda obtenidos con el programa Gel Pro. La banda de PCR Delete, empleada para detectar la recombinación, sólo se detecta en las células YFP+.

Con estos resultados, se puede considerar que gran parte de las células que presentan fenotipo YFP+ han experimentado recombinación en el locus N1 y, por lo tanto, han sufrido la pérdida de función del gen Notch1. Esta delección es específica para células YFP+, y no se detecta banda delete de recombinación en las células YFP-.

2.3. Expresión de los Genes Diana de Notch en Progenitores c-kit+ de Hígado Fetal E14 con Delección Condicional de Notch1.

Los datos mostrados indican que gran parte de las células que presentan fenotipo YFP+, han experimentado recombinación en el locus N1 y, por lo tanto, han sufrido la pérdida de función del gen Notch1. Para determinar el grado de pérdida de función de Notch1 en CHM/progenitores fetales se determina el nivel de expresión por qPCR en poblaciones c-kit+.

Se obtiene el cDNA de células c-kit+YFP+ y c-kit+YFP- del hígado fetal E14 de los embriones silvestres ($N1^{+/+}$), y mutantes condicionales ($N1^{-/-}$) tratados con Tx, y se determina el nivel de expresión de Notch1 por qPCR. Se observa una reducción media del 50% en los niveles de transcripción de Notch1 en células c-kit+YFP+ (Figura 54). Estos datos están en consonancia con la recombinación no completa del locus Notch1.

Los niveles de transcripción de genes modulados por notch, GATA2 y Hes1 también presentan una disminución en la población c-kit+YFP+, en consonancia con los bajos niveles de Notch1 (Figura 54). Esta disminución es específica para las células YFP+ ya que no se detecta en la población YFP-.

Por tanto, los mutantes condicionales Notch1 inducidos por SCL-CreTM/Tx presentan una reducción parcial de la actividad del Notch1.

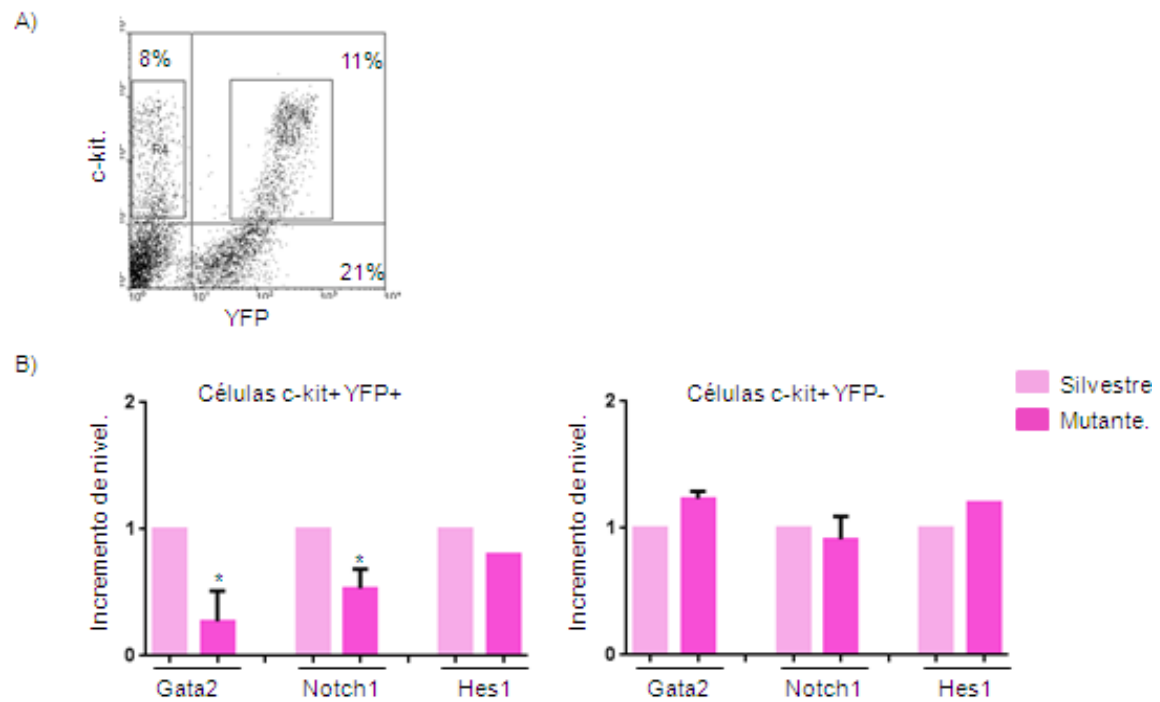


FIGURA 54. Análisis de niveles de expresión de genes diana de Notch en hígado fetal E14 mutantes condicionales para Notch1 inducidos con Tx. Células c-Kit+YFP+ y c-Kit+YFP- son sorteadas de HF E14 individuales procedentes de animales SCL-CreER^T;Notch1^{flf};R26R-EYFP^{flf} (N1^{-/-}) y SCL-CreER^T;Notch1^{+/+};R26R-EYFP^{flf} (N1^{+/+}) tratados con Tx. **A)** Dot-plot representativo de las poblaciones sorteadas de hígado fetal E14 N1^{-/-}. **B)** Expresión relativa de genes diana de Notch determinados por qPCR en las células sorteadas de hígado fetal E14 c-kit+YFP+ y c-kit+YFP- en los embriones silvestres N1^{+/+} y mutantes N1^{-/-}. En las células c-kit+YFP+ N1^{-/-} se observa una disminución de Notch1 y también de GATA2. Estas diferencias no se observan en las células c-kit+YFP-. Se muestra la media de tres experimentos excepto en el caso de Hes1 (un experimento).

Conclusiones punto 2.2.

- En los ratones triples transgénicos SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch^{flf}, la expresión de YFP tras la inyección intraperitoneal de tamoxifeno, puede correlacionarse con la delección de Notch1 de forma específica.
- La delección condicional de Notch1 obtenida con el sistema empleado en este trabajo no es efectiva al 100%, y deberá tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

2.4. Análisis Fenotípico del Hígado Fetal E14 de los Mutantes Condicionales de Notch1.

Para analizar el efecto de falta de función de Notch1, se cruzaron ratones SCL-CreER^T;Notch1^{ff};R26R-YFP^{ff} entre sí. Como control, se analizaron embriones derivados del cruce de ratones SCL-CreER^T;Notch1^{+/+};R26R-YFP^{ff}. Después del tratamiento con tamoxifeno, se determinó en cada embrión el número de células en el hígado fetal y por citometría de flujo, el porcentaje de células YFP⁺, c-kit⁺ (progenitores), Ter119⁺ (eritrocitos) y Mac1⁺ (progenitores y mieloides), (figura 55). Mientras que no se observaron diferencias significativas en cuanto al número total de células en el hígado fetal, el porcentaje de células YFP⁺ junto con el porcentaje de células c-kit y Mac1 (progenitores), se reduce a la mitad aproximadamente (Figura 55 B). Dos factores podrían influir en esta reducción: por una parte, la disminución de progenitores en el hígado podría estar relacionada con un menor aporte de células madre/progenitores procedentes del AGM, que habrían sido eliminadas en momentos tempranos debido a un bloqueo de la diferenciación hemogénica a CMHs en estadio E10-E11 (Kumano, Chiba et al. 2003). Alternativamente, la disminución en progenitores podría estar relacionada con un defecto de proliferación de progenitores de hígado fetal en ausencia de Notch1. Sin embargo, el porcentaje de progenitores c-kit⁺ en las células YFP⁺ es similar en mutantes condicionales N1^{-/-} y controles N1^{+/+} (Figura 55 C).

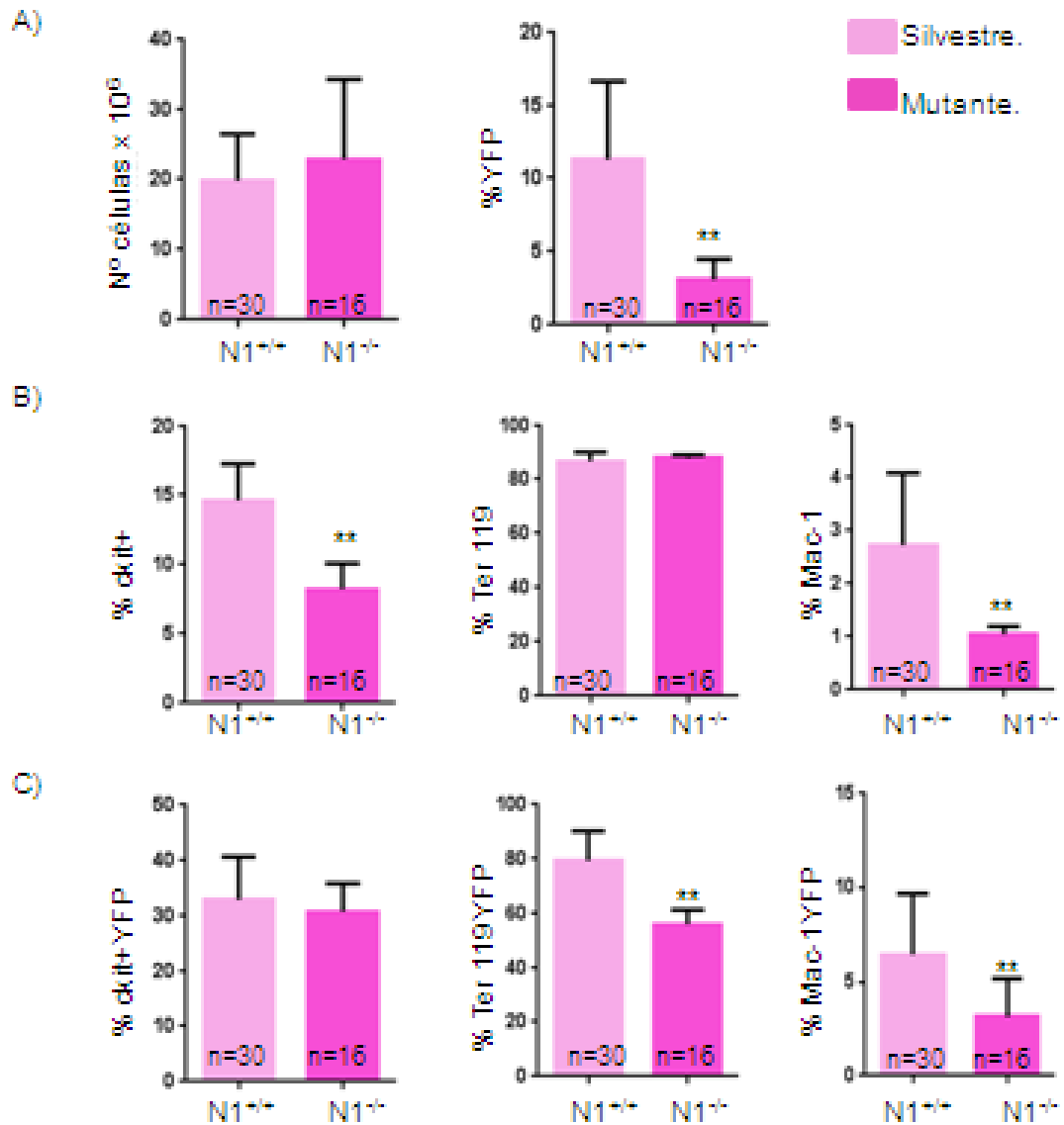


FIGURA 55. Análisis fenotípico de células de hígado fetal E14 mutante condicionales para Notch1. Los embriones control (N1^{+/+}) y mutantes condicionales (N1^{-/-}) se obtuvieron de cruces SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch^{+/+} y cruces SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch^{fl/fl} respectivamente y tras el tratamiento de las madres gestantes con Tamoxifeno. **A)** Histogramas mostrando el número total de células en el hígado y los porcentajes de expresión de YFP. **B)** Análisis del porcentaje de progenitores, células eritroides y células mieloides en el hígado fetal de los embriones silvestres y mutantes condicionales para Notch1. **C)** Composición celular referido a la población YFP+ (considerada como el 100% de la población). Se analizan un total de 16 embriones mutantes y 30 silvestres. Análisis estadístico t de student p<0, 05.

Estos datos son consistentes con la idea de que el potencial de proliferación no está afectado en progenitores $N1^{-/-}$ y, por tanto, la disminución de células YFP+ y c-kit+ en el hígado fetal podría deberse a un defecto en su generación en otras localizaciones, incluyendo el AGM.

Aunque el porcentaje de progenitores c-kit+ en las células YFP+ es similar en mutantes condicionales $N1^{-/-}$ y controles $N1^{+/+}$, sin embargo, se observó una disminución en el porcentaje de células Ter119+ (eritroides) y Mac1+ (progenitore/mieloides) (Figura 55C), lo cual podría indicar un defecto en la diferenciación de los progenitores. Para determinar la capacidad funcional de los progenitores en mutantes condicionales $N1^{-/-}$, se analizó su capacidad de generar colonias hematopoyéticas mieloeritroides in vitro (CFU-C).

2.5. Ensayo de Colonias CFU-C en el Hígado Fetal E14 de Mutantes Condicionales para Notch1.

En primer lugar, se determinó la frecuencia de progenitores CFU-C en la población YFP+ procedente de animales mutantes condicionales $N1^{-/-}$ y silvestres $N1^{+/+}$, tras la administración de tamoxifeno. En la subpoblación YFP+ de animales $N1^{-/-}$, se observó un mayor número de CFU-C que en los controles silvestres. Considerando que el contenido de células progenitoras c-kit+ es similar dentro de la población YFP+ procedente de animales mutantes y silvestres (Figura 55C), estos datos sugieren un incremento en progenitores CFU-C en ausencia de Notch1. Para confirmar este punto se refinó el experimento comparando el potencial CFU-C entre células kit+YFP+ y kit+YFP- procedentes de mismos individuos mutantes condicionales $N1^{-/-}$. Como se muestra en la figura 56 C, la población c-kit+YFP+ presenta un incremento de 2-3 x en el número de CFU-C con respecto a la YFP- c-Kit+, apoyando la idea de que la falta de Notch1 bloquea la diferenciación de progenitores en el hígado fetal.

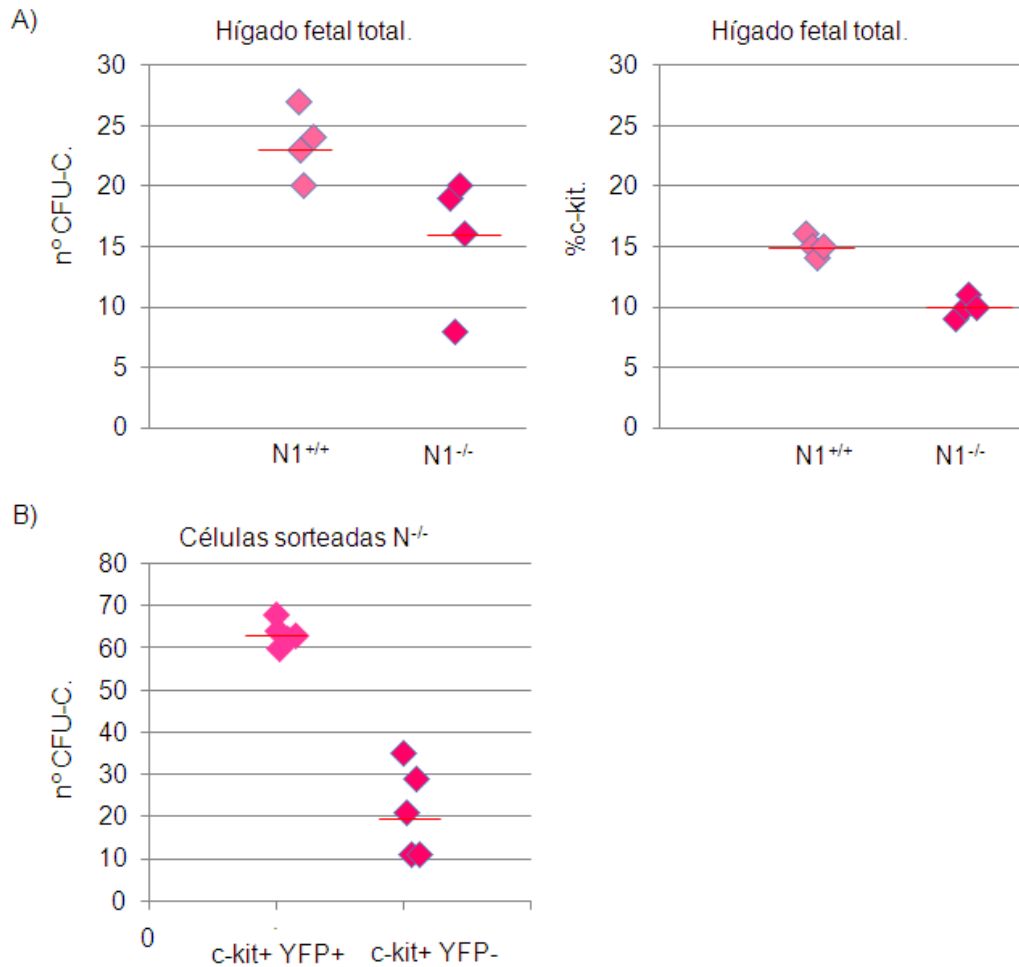


FIGURA 56. Análisis de progenitores mieloides CFU-C y porcentaje de células c-kit⁺ en el hígado fetal de los embriones SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch^{fl/fl} tras la inyección de tamoxifeno. **A)** Ensayo CFU-C con hígado fetal total. A la izquierda se muestra el número de colonias obtenidas en cada experimento realizado. Las células silvestres (N1^{+/+}) generan más colonias que las mutantes (N1^{-/-}). A la derecha, se muestra la expresión de c-kit en el hígado fetal de los embriones empleados en cada experimento. Se observa que el porcentaje de progenitores (c-kit⁺) es menor en los individuos Notch1^{-/-} respecto a los silvestres, donde también está incrementado el número de progenitores mieloides CFU-C. **B)** Para determinar el potencial CFU-C en las células mutantes N1^{-/-}, se aíslan las células c-kit⁺YFP⁺ y células ckit+yfp⁻ mediante FACS. A la derecha se representa el número de colonias obtenido en cada experimento de sorteo. Las células c-kit⁺YFP⁺ mutantes presentan mayor actividad CFU-C en comparación con las células c-kit⁺YFP⁻. A la derecha se muestra el valor c-kit⁺ para las células sorteadas YFP. Los valores medios se representan con una línea roja. Cinco embriones analizados.

3. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS MUTANTES CONDICIONALES PARA NOTCH1 EN TRASPLANTES.

3.1. Análisis de la Capacidad de Repoblación a Corto Plazo.

Para estudiar la funcionalidad de los progenitores y CMH de hígado fetal en mutantes condicionales $N1^{-/-}$, se realizaron ensayos de trasplante y repoblación a corto y largo plazo. 1×10^6 de células obtenidas de hígado fetal E14 mutante condicional $N1^{-/-}$ y control $N1^{+/+}$, procedentes de cruces de ratones SCL-Cre;R26R-EYFP; Notch $^{-/-}$ o de cruces SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch $^{+/+}$ fueron transferidas a receptores recién nacidos tratados con busulfan. Transcurrido un mes del trasplante, se analizó la sangre periférica de los ratones inyectados mediante citometría de flujo para determinar la capacidad de repoblación y el porcentaje de células donantes YFP, B220 (linfocitos B), Mac1 (mieloides) Y CD4CD8 (linfocitos T) (figura 57)

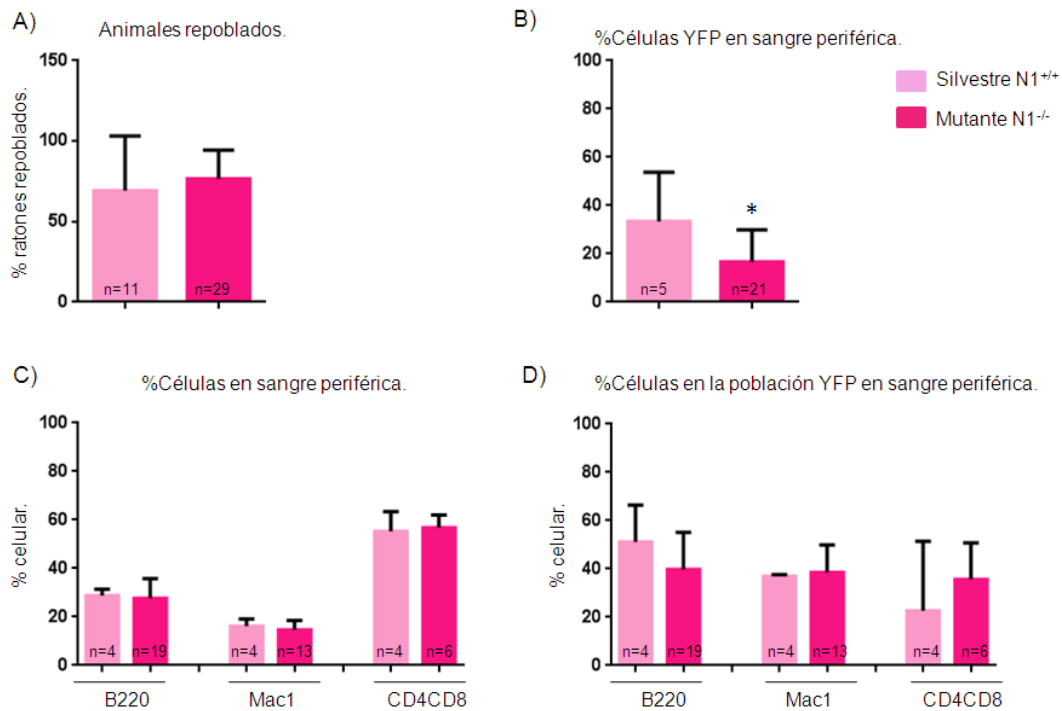


FIGURA 57. Análisis mediante citometría de flujo en sangre periférica de los ratones trasplantados con células de hígado fetal silvestre ($N1^{+/+}$) y mutante condicional ($N1^{-/-}$) inyectados con tamoxifeno. **A)** Porcentaje de animales repoblados (presentando >1% de células donantes YFP+) al mes del trasplante. Se analizan tres camadas trasplantadas con células silvestres y cuatro camadas inyectadas con células de hígado fetal $N1^{-/-}$. **B)** Se representa la media de células YFP+ presentes en la circulación de las quimeras a corto plazo. El porcentaje de células donantes en las quimeras trasplantadas con células de hígado fetal $N1^{-/-}$ es menor que el de las trasplantadas con células $Notch1^{+/+}$. **C)** Histogramas representando el porcentaje de células B220, Mac1 y CD4CD8 positivas en la sangre de las quimeras generadas con células de hígado fetal silvestre ($Notch1^{+/+}$) y mutante ($Notch1^{-/-}$) inyectado con tamoxifeno. **D)** Se representa el porcentaje de células B220, Mac1 y CD4CD8 positivas dentro de la población YFP positiva de sangre periférica en las quimeras generadas con células silvestres y mutantes de hígado fetal. Análisis t de student $p < 0,05$.

Los resultados mostraron que tanto las células de hígado fetal silvestre como mutante, tras la inyección de tamoxifeno, pueden repoblar a corto plazo con una frecuencia similar (figura 57A), aunque las quimeras generadas con células $Notch1^{-/-}$ presentan menor porcentaje de células donantes en sangre periférica (figura 57B). En cuanto al porcentaje total de células B220, Mac1 y CD4CD8 positivas en la sangre periférica, no se observaron diferencias entre las quimeras inyectadas con células de hígado fetal silvestre y las inyectadas con células mutantes (Figura 57C). Tampoco se observaron diferencias significativas al analizar la composición celular de la fracción YFP+ en sangre periférica.

3.2. Análisis de la Capacidad de Repoblación a Largo Plazo.

Animales trasplantados con 1×10^6 de células obtenidas de hígado fetal E14 mutante condicional $N1^{-/-}$ y control $N1^{+/+}$, fueron analizadas a los 4-5 meses post trasplante. Se analizó el porcentaje de células donantes en sangre, médula ósea bazo, y timo, determinándose el contenido en células B, células T, mieloides y progenitores lin- c-kit+.

En el caso de la médula ósea, no se observaron diferencias en cuanto al número total de células. En cuanto al análisis de las poblaciones celulares derivado de las células donantes YFP, se observó una disminución de las células T CD8+ (figura 58). Resultados similares se obtienen en el bazo (Figura 59). En la sangre, la disminución de linfocitos T es significativa tanto para T CD4+ como T CD8+. En ningún caso se observa incremento de linfocitos dobles positivos CD4+CD8+. También hay que resaltar que el porcentaje de linfocitos B están incrementados en la población YFP+ derivada de hígado fetal N1 mutante en todos los órganos, pero de forma significativa sólo en la circulación. Esta tendencia a la disminución de linfocitos T, e incremento de linfocitos B coincide con datos publicados sobre el efecto de la delección de Notch1 en ratones adultos y el fenotipo que presentan las quimeras repobladas con médula ósea mutante para Notch1.

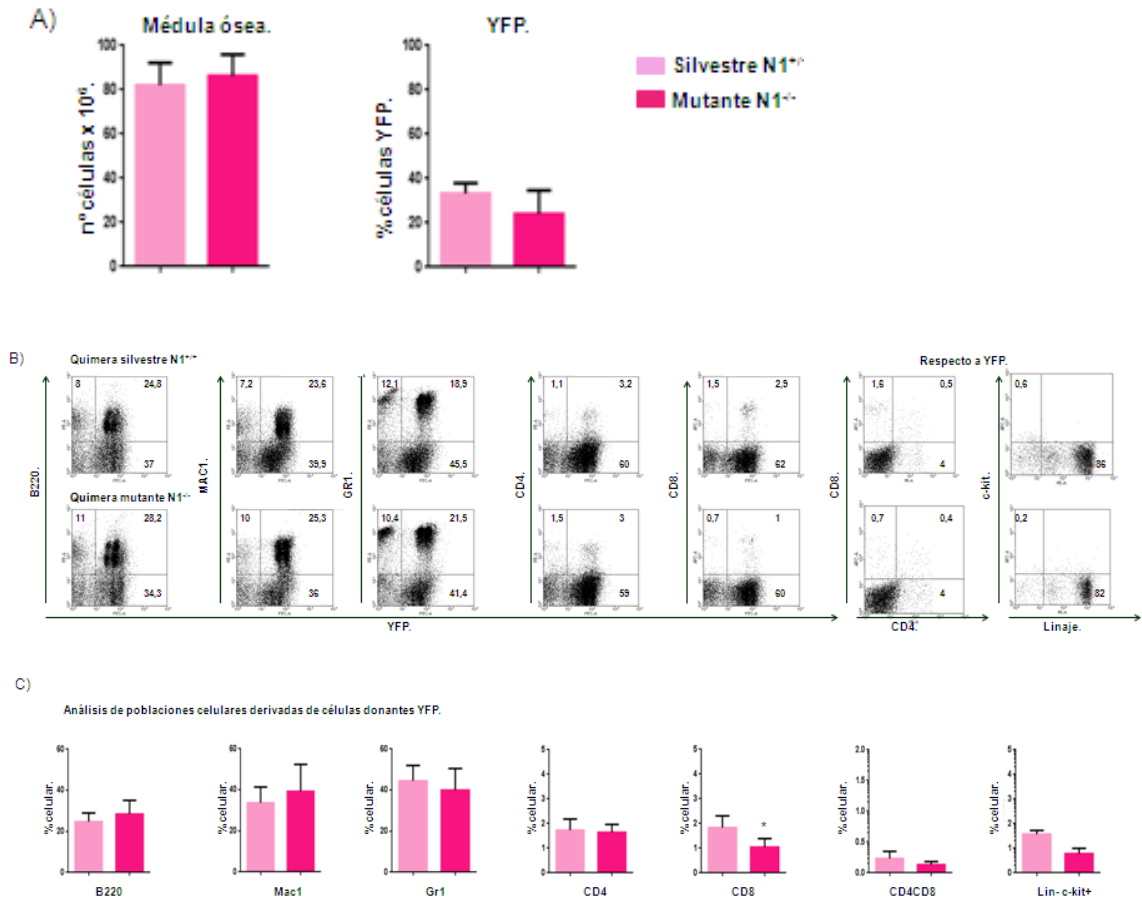


FIGURA 58. Repoblación a largo plazo: Análisis de médula ósea de las quimeras generadas con células de hígado fetal E14 control $Notch^{+/+}$ y mutantes condicionales $Notch^{-/-}$. **A)** En la parte superior se muestra el número total de células y el porcentaje de células donantes presentes en la médula (YFP). **B)** Se muestran dot-plot representativos del análisis mediante citometría de flujo para doble tinción con cada marcador analizado y las células donantes YFP. Se emplean triples marcadores en la tinción CD4/CD8/YFP y Lin/c-Kit/YFP. Donde los dot-plots representan la expresión de marcadores en la población YFP+. **C)** Histogramas mostrando valores medios para cada población dentro de la población YFP. Media obtenida del análisis de tres quimeras de hígado fetal $Notch^{+/+}$ y seis quimeras de hígado fetal $Notch^{-/-}$. Análisis estadístico t de student.

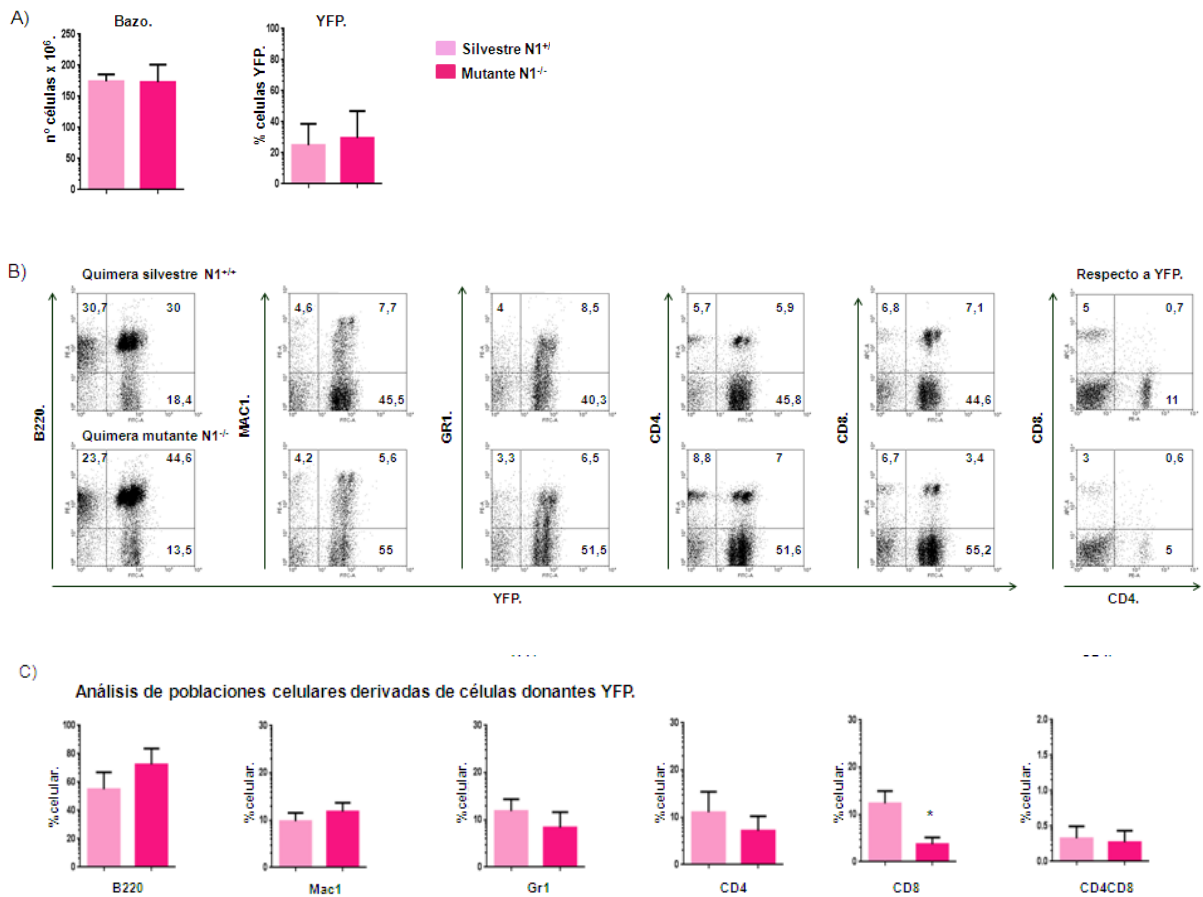


FIGURA 59. Repoblación a largo plazo: Análisis del bazo de las quimeras generadas con células de hígado fetal E14 control Notch^{+/+} y mutantes condicionales Notch^{-/-}. **A)** En la parte superior se muestra el número total de células y el porcentaje de células donantes presentes en el bazo (YFP). **B)** Se muestran dot-plot representativos del análisis mediante citometría de flujo de cada marcador analizado. El dot-plot que muestra las poblaciones CD4 CD8, se refiere a la población YFP+ (último a la derecha). **C)** En la parte inferior se muestra el análisis de poblaciones celulares dentro de la población YFP. Se analizaron tres quimeras de hígado fetal SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch^{+/+} y seis quimeras de hígado fetal SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch^{-/-}. Análisis estadístico t de student.

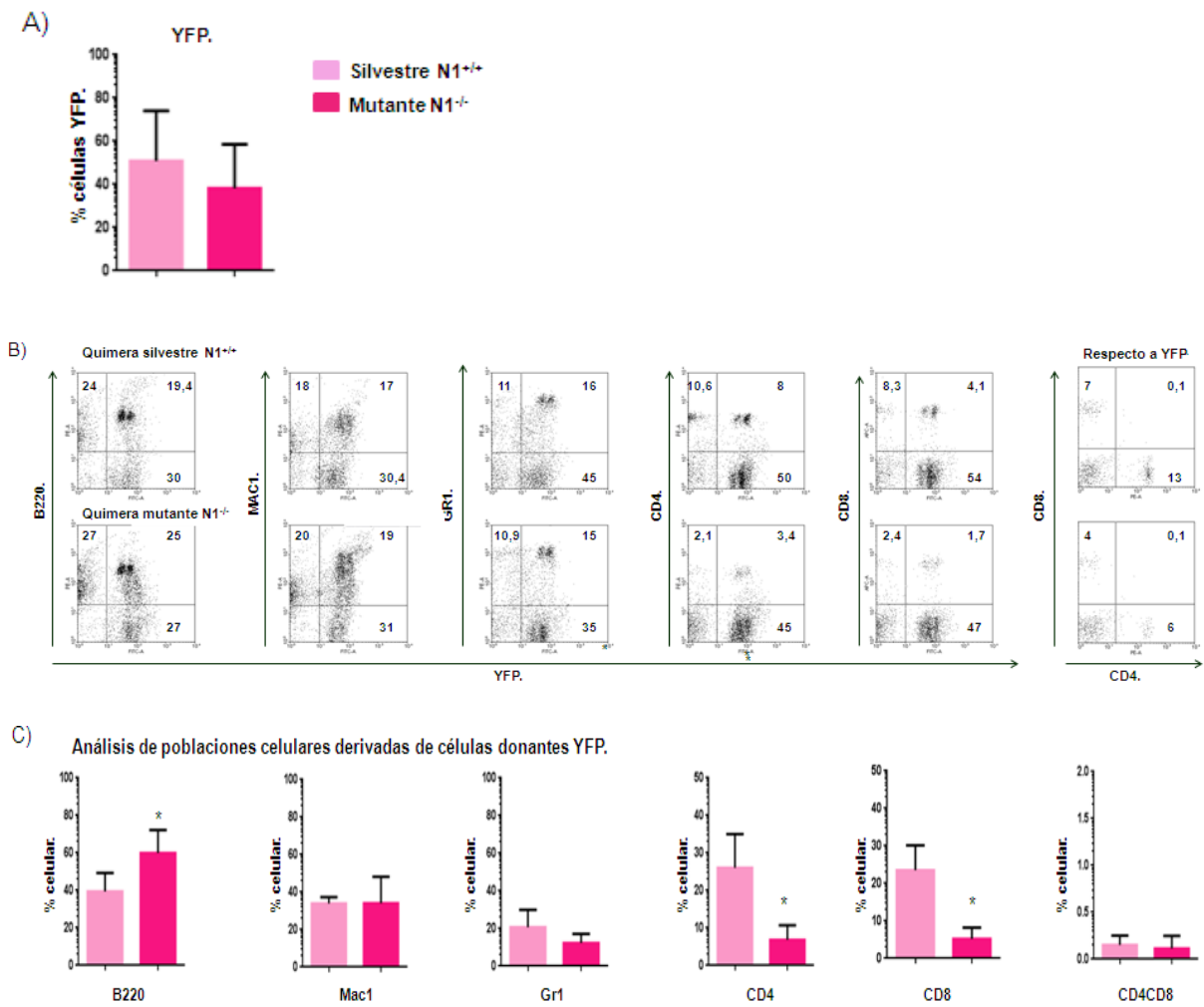


FIGURA 60. Repoblación a largo plazo: Análisis de sangre de las quimeras generadas con células de hígado fetal E14 control Notch^{+/+} y mutantes condicionales Notch^{-/-}. **A)** En la parte superior se muestra el número total de células y el porcentaje de células donantes presentes en la sangre (YFP). **B)** Se muestran dot-plot representativos del análisis mediante citometría de flujo de cada marcador analizado. El dot-plot donde se representan las poblaciones CD4 CD8 está referido a la población YFP positiva. **C)** En la parte inferior se muestra el análisis de poblaciones celulares dentro de la población YFP. Se analizaron tres quimeras de hígado fetal SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch^{+/+} y seis quimeras de hígado fetal SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch^{-/-}. Análisis estadístico t de student.

En el caso del timo, se analizó el porcentaje de células B (B200) y T (CD4, CD8). No se observó ninguna diferencia significativa entre los animales analizados (figura 61). Este dato es relativamente sorprendente, y contrasta con los datos publicados por el grupo de Radtke et al (Radtke, Wilson et al. 1999), donde muestran que las células de médula osea adulta mutantes para Notch1 no contribuyen a los timocitos en ensayos de trasplante en quimeras irradiadas. Esto sugeriría que los progenitores T fetales pueden ser refractarios a la falta de función de Notch y repoblar el timo, al menos durante los 4 meses post trasplante, ya que en la circulación si se empieza a apreciar una reducción de linfocitos T. Alternativamente, el timo podría ser repoblado por una fracción de células en las que no ha ocurrido la recombinación, y compiten con las células realmente mutantes para Nocht1. Para determinar este punto, se analizó el estatus de recombinación y niveles de transcritos para Notch1 en la población YFP+ de las quimeras.

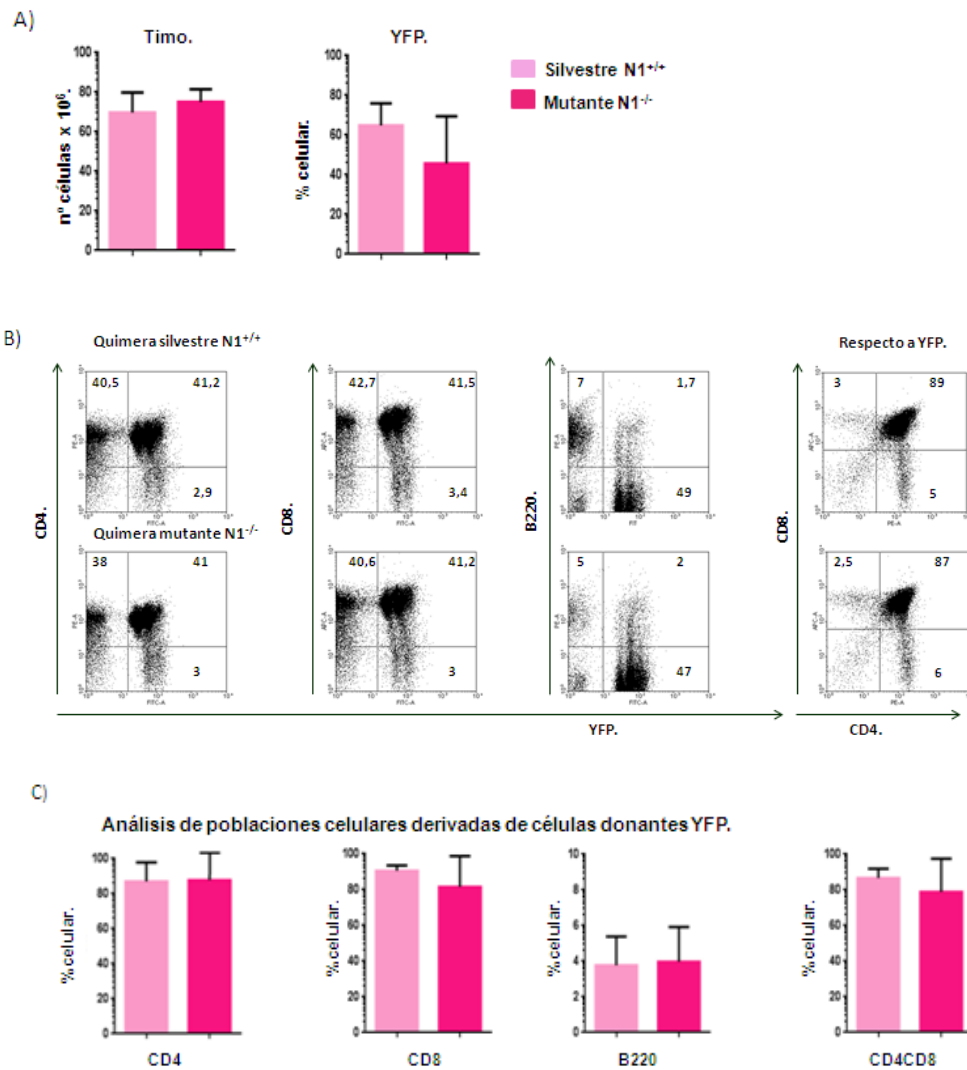


FIGURA 61. Repoblación a largo plazo: Análisis del timo de las quimeras generadas con células de hígado fetal E14 control Notch^{+/+} y mutantes condicionales Notch^{-/-}. **A)** En la parte superior se muestra el número total de células y el porcentaje de células donantes presentes en el timo (YFP). El dot-plot de la población CD4 CD8 está referido a la población YFP positiva. **B)** Se muestran dot-plot representativos del análisis mediante citometría de flujo de cada marcador analizado. **C)** En la parte inferior se muestra el análisis de poblaciones celulares dentro de la población YFP. Se analizaron tres quimeras de hígado fetal SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch^{+/+} y seis quimeras de hígado fetal SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch^{-/-}. Análisis estadístico t de student.

Para comprobar que las células YFP de las quimeras han recombinado el locus Notch1, se sortearon las poblaciones YFP+ y YFP- del timo, bazo y médula ósea de las quimeras y se analizó mediante PCR la presencia de Notch1 y de la banda de recombinación Delete. Como se muestra en la figura 62, sólo las poblaciones YFP+ de los órganos procedentes de quimeras inyectadas con células de hígado fetal mutante condicional Notch^{-/-}, presentaban banda Delete y ausencia de banda no recombinada Notch1^f.

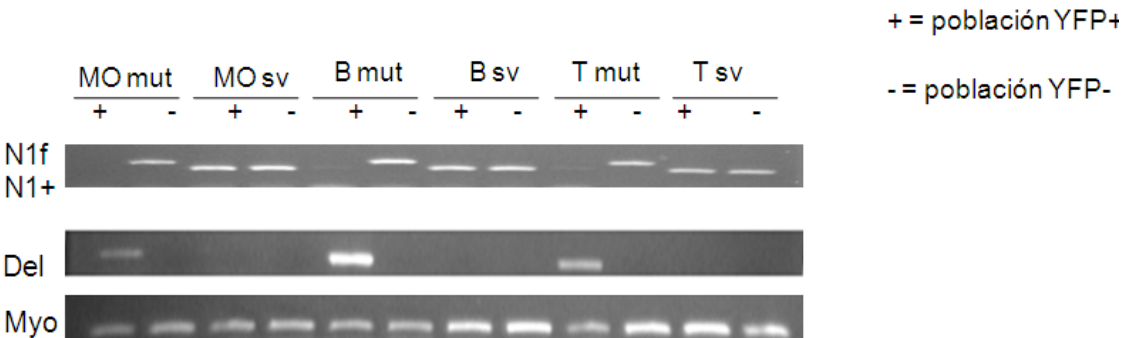


FIGURA 62. Eficiencia de recombinación del locus Notch1^{ff} en células sorteadas YFP+ y YFP- de médula ósea (MO), bazo (B) y timo (T), procedente de las quimeras inyectadas con células de hígado fetal E14 Notch^{+/+} (sv) y Notch^{-/-} (mut). Se iguala su concentración a 20 ng/μl y se realiza PCR de Notch1lox para comprobar la desaparición del alelo floxeado y PCR Del, para confirmar la delección. Para confirmar que hay DNA se emplea myo. Se muestra un ejemplo de cinco experimentos realizados.

Con el fin de determinar si la producción de Notch1 estaba afectada a nivel de RNA, se aislaron las células YFP+ y YFP- del timo, bazo y médula ósea de las quimeras por FACs y se obtuvo el cDNA. Se emplearon en torno a 10 000 células YFP+ y 50 000 YFP-. Mediate qPCR, se observó una drástica disminución de los niveles de Notch1 en la población YFP+ de los órganos de las quimeras generadas con células Notch^{-/-}. Esta disminución no se observó en las células YFP- (figura 63).

Expresión de Notch1 mediante qPCR.

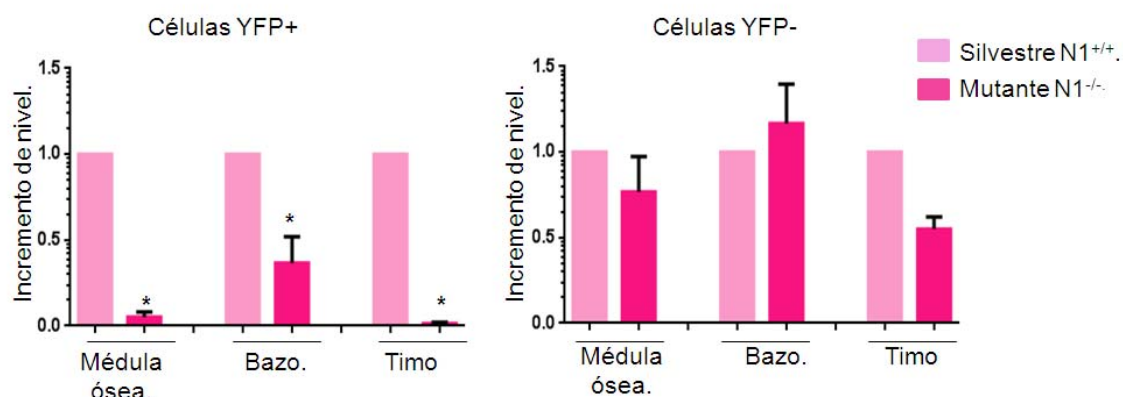


FIGURA 63. Análisis de la expresión de Notch1 en células sorteadas YFP+ y YFP- de médula ósea, bazo y timo de las quimeras a largo plazo mediante qPCR. A la izquierda se muestra la expresión de Notch1 en las células YFP+ de las quimeras SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch^{+/+} (Silvestre N1^{+/+}), y SCL-Cre;R26R-EYFP;Notch^{-/-} (Mutante N1^{-/-}). A la derecha se muestra la expresión de Notch1 en las células YFP-. Como control endógeno se emplea Gapdh. Se muestra la media de cuatro experimentos realizados.

Conclusiones punto 3.

a) Células fetales mutantes condicionales para Notch1 generan todos los linajes celulares circulantes a las 4 semanas post trasplante. No se observaron diferencias en su capacidad de generación de linfocitos B, T o mieloides con respecto al control N^{+/+}.

b) En trasplantes a largo plazo, las quimeras generadas con células fetales mutantes condicionales para Notch1 presentan menor porcentaje de linfocitos T CD4 y CD8, y un incremento en linfocitos B derivados del donante. Sin embargo, contribuyen normalmente al desarrollo de las poblaciones del timo.

Estos datos sugieren que la falta de función de Notch1 no afecta a la capacidad de repoblación de las CMHs fetales, al igual que lo publicado para CMHs adultas. Cabe destacar que la falta de función de Notch1 tampoco afecta a los progenitores T fetales, sin embargo, como otros han publicado, inhibe drásticamente la diferenciación de linfocitos T adultos.

c) En las células YFP+ procedentes de quimeras inyectadas con células Notch^{-/-}, se observa banda de delección Delete y una drástica disminución de los niveles de Notch1.

RESUMEN DE RESULTADOS.

1. Los transgénicos para SCL-NIC expresan NIC a nivel de RNA y proteína en la población de progenitores hematopoyéticos Lin-cKit⁺ de adulto (médula ósea) y de naturaleza fetal (hígado fetal y médula ósea neonatal).
2. Los transgénicos para SCL-NIC son viables. El fenotipo hematopoyético fetal y adulto es casi normal. Solo se observa una disminución significativa de los linfocitos B en animales adultos.
3. La expresión de NIC en progenitores Lin-c-Kit⁺ de adulto induce un incremento de los niveles de genes diana de Notch, GATA2, Hes1 y Notch1. Los niveles no se ven incrementados en progenitores Lin-c-Kit⁺ fetales (hígado fetal y médula ósea neonatal).
4. Las células madre hematopoyéticas (CMHs) adultas, derivadas de a transgénicos SCL-NIC, presentan una disminución de la capacidad de repoblación a largo plazo del sistema hematopoyético. La capacidad de repoblación de las células fetales SCL-NIC no está afectada.
5. La frecuencia de CMHs en la médula ósea adulta de ratones SCL-NIC está disminuida. La frecuencia de CMHs funcionales no está disminuida en el hígado fetal de transgénicos SCL-NIC.
6. Las CMHs SCL-NIC de adulto, no pueden competir con CMHs silvestres en ensayos de cotrasplante y repoblación a largo plazo. Las células fetales SCL-NIC de hígado y de medula de recién nacido compiten con las CMHs silvestres y ambas consiguen repoblar.
7. En ensayos de trasplante y repoblación a corto plazo, los progenitores Lin- c-Kit⁺ SCL-NIC de adulto se expanden y diferencian de forma más efectiva que los progenitores derivados de animales control. Las células de hígado fetal SCL-NIC no presentan diferencias.
9. En trasplantes secundarios, las CMHs derivadas de hígado fetal SCL-NIC, adquieren características de CMHs adultas, perdiendo su capacidad de repoblación e incrementando los niveles de los genes diana de Notch.

10. Las CMHs adultas recuperan su capacidad de repoblación a largo plazo cuando son trasplantadas en receptores SCL-NIC que expresan NIC en células estromales de médula.
11. La administración de tamoxifeno en madres gestantes SCL-Cre/Notch^{ff} induce recombinación del locus Notch1 con alta eficiencia en células de hígado fetal de embriones E14. La recombinación es específica para progenitores c-kit⁺ de hígado fetal y produce una disminución de transcritos para Notch1.
12. La delección condicional de Notch1 en el hígado fetal, determina un incremento de progenitores CFU-C en la población c-kit⁺.
13. La delección condicional de Notch1 en el hígado fetal, no parece afectar a la capacidad de repoblación de las CMHs. Se observa una disminución de linfocitos T circulantes.

DISCUSIÓN.

El sistema hematopoyético está formado por diferentes tipos de células que intervienen en funciones vitales, tales como la defensa inmune, la coagulación y la distribución de oxígeno. Estas células son renovadas a lo largo de toda la vida del individuo gracias a la existencia, en la médula ósea, de un reducido grupo de células madre hematopoyéticas (CMHs). Estas células sustentan la hematopoyesis durante toda la vida del individuo, presentando diferentes características durante el desarrollo y a lo largo del cual, sufren procesos de diferenciación o auto renovación. Estos procesos deben ser controlados cuidadosamente durante la organogénesis, la homeostasis de los tejidos y su regeneración, ya que cualquier fallo en el mantenimiento o la actividad de las CMHs, puede provocar alteraciones en los tejidos y dar lugar a enfermedades graves como la leucemia.

Con el objetivo de analizar comparativamente la acción de Notch1 en CMHs de origen fetal adulto de ratón, en este trabajo de Tesis se han realizado estudios de ganancia y pérdida de función de Notch1. Para ello, se generaron animales transgénicos con el vector SCL-3'Enh dirigiendo la expresión de Notch1 activado (NIC), y mutantes condicionales SCL-Cre/Notch1lox, en células madre y progenitores hematopoyéticos, y se ha analizado la función de las CMHs en trasplantes. Los resultados muestran que la activación de Notch en las células madre adultas, induce un incremento de progenitores y promueve la diferenciación a corto plazo. A largo plazo, se produce una pérdida de CMHs. Estos datos son consistentes con la idea de que la activación de Notch en CMH adultas fuerza su diferenciación a corto plazo. y el agotamiento o pérdida de autorenovación a largo plazo. Las CMH fetales, por el contrario, son refractarias a la activación de Notch. Los mutantes condicionales para Notch1, no muestran, sin embargo ningún fenotipo en las CMHs. Estos datos resaltan la importancia que tiene determinar el estadio ontogénico de la célula madre para predecir su respuesta a genes capaces de modular la capacidad de injerto.

1. LA CONSTRUCCIÓN TRANSGÉNICA SCL NIC 3'ENH.

La construcción transgénica empleada en este estudio es una forma atenuada del dominio intracelular del receptor Notch 1 (NIC), que fue descrito en 1996 por E. Robey (Robey, Chang et al. 1996), y se corresponde con la parte activa de esta molécula. Esta forma atenuada carece de la zona PEST y una parte de la zona TAD, y tiene unido un polipéptido Flag. La ausencia de la zona PEST implica la pérdida de la señal para la degradación de Notch lo que, en principio, incrementa la actividad del NIC1. La expresión de esta forma NIC influye en la diferenciación de linfocitos T, sin embargo, tiene una mínima incidencia en la generación de tumores como ya habían descrito previamente (Fowlkes and Robey 2002).

La ventaja de emplear esta forma atenuada del transgén, es que las líneas de ratón transgénicas no desarrollan leucemias y, por tanto, no mueren a edades tempranas. Seguramente esto es debido a que son necesarios niveles altos de activación Notch1 para generar enfermedad. El uso del vector de expresión SCL-3'Enh, de activación restringida a células madre y progenitores, junto al hecho de que empleamos una forma atenuada del gen, hace que la expresión del transgén tenga un impacto atenuado/nulo en la generación de leucemias.

El primer punto que se debe estudiar, es si la construcción transgénica que empleamos tiene un efecto activador. El incremento de los niveles de ciertos genes diana de Notch así parece indicarlo (Figura 20). Además, se han publicado trabajos previos en los que demuestran que una construcción transgénica con una estructura similar, es capaz de activar en líneas celulares y en linfocitos T diferentes genes como por ejemplo Hes1, y tiene capacidad de transactivación (Aster, Xu et al. 2000). En este artículo estudian la estructura del receptor Notch con diversas modificaciones y analizan el efecto de estas estructuras en ensayos *in vivo* (trasplantes de médula ósea) e *in vitro*. Concluyen que tanto la región ankirina como la zona TAD son necesarias para inducir leucemia.

En este trabajo demostramos, mediante RT-PCR y citometría de flujo para Flag, que NIC se expresa en las células de la médula ósea y del hígado fetal de los ratones transgénicos. Además, hemos comprobado mediante qPCR que los niveles de expresión de diferentes genes diana de la ruta de Notch, como GATA2 o Hes1, se

encuentran incrementados. Hes (Hairy/Enhancer of Split), es uno de los genes diana de Notch mejor caracterizados, y su incremento se asocia con la activación de Notch1 (Iso, Kedes et al. 2003). Sin embargo, no observamos este incremento de la expresión de los genes diana en el hígado fetal, lo que parece indicar que el incremento de Notch1 no tiene efecto sobre estas células. De hecho, parece que en las células de hígado fetal transgénico presentan niveles disminuidos de expresión de GATA2 y Hes1,

2 ACTIVACIÓN DE NOTCH1 EN LAS CMHS DE ADULTO. ¿CONTROL DE LA QUIESCENCIA Y AUTORENOVACIÓN?

Como ya hemos indicado, nuestros resultados muestran que la activación de Notch1 en las células madre adultas, induce un incremento de progenitores y promueve la diferenciación a corto plazo. A largo plazo, se produce una pérdida de CMHs. Estos datos son consistentes con la idea de que la activación de Notch en CMHs adultas fuerza su diferenciación a corto plazo, y el agotamiento o pérdida de CMHs a largo plazo. Según datos de otros grupos, este efecto podría estar mediado por una desregulación en la capacidad de autorenovación, es decir, de generar más CMH.

La producción de las células de sangre depende de la capacidad regenerativa de las CMHs que residen en la médula ósea en el adulto. Esta propiedad constituye la base de los ensayos de funcionalidad de CMHs. En estos ensayos, se determina la capacidad de las células donantes para repoblar durante largo tiempo todos los linajes hematopoyéticos del receptor. La persistencia de células maduras depende, de forma crítica, de que las CMHs conserven a lo largo del tiempo y después de múltiples divisiones, la capacidad de auto-renovarse (self-renewal), es decir, que al dividirse al menos una de las células hijas siga siendo CMH. Esta es la propiedad fundamental para generar células hematopoyéticas durante toda la vida. Se denominan CMHs con capacidad de repoblación a largo plazo (LT-HSC). Las CMHs que pueden repoblar pero no autorenovarse indefinidamente son las CMH, o más correctamente, los progenitores multipotentes con capacidad de repoblación a corto plazo (ST-HSC). El control de la autorenovación es, por tanto, esencial para el mantenimiento de CMHs.

Los mecanismos que controlan la autorenovación de las CMHs se consideran en

general, relacionados con el control del ciclo celular (Orford and Scadden 2008). En el adulto, la mayoría de las CMHs son quiescentes, están en la fase G₀, y pueden pasar a dividirse en respuesta a diversos factores incluyendo citoquinas o daño celular. El estado de quiescencia de las CMHs adultas es reversible. La regulación del equilibrio quiescencia/división es crítico para la función a largo plazo como célula madre. Esto se ha puesto de manifiesto en diversos modelos de mutantes, entre los que se encuentran mutantes para factores de transcripción como CdKn1, Gfi1, SCL, Id1, Pten, Foxo1, 3 y 4, c-Myc y GATA2. Estos mutantes exhiben un incremento de ciclo celular en las CMHs y en paralelo, todos presentan un deficiente mantenimiento del pool de CMHs. Por tanto, la salida a ciclo hace perder la quiescencia y esto conlleva la pérdida de CMH-LT (Cheng, Rodrigues et al. 2000; Wilson, Murphy et al. 2004; Zeng, Yucel et al. 2004; Baena, Ortiz et al. 2007; Tipping, Pina et al. 2009; Lacombe, Herblot et al. 2010).

Así mismo, diverso número de mutantes para factores externos intervienen en el control de la autorenovación incluyendo Wnt, BMPs and Notch. En relación con Notch, trabajos iniciales en ratón indican que la activación de Notch en CMH/ progenitoras definidas como Lin- c-kit⁺ inducía una expansión/acumulación de CMHs, e inhibía su diferenciación (Varnum-Finney, Xu et al. 2000; Stier, Cheng et al. 2002). Estudios más recientes, sin embargo, parecen demostrar que la activación de Notch induce un bloqueo a largo plazo en la generación de CMHs, aunque inicialmente provoca la expansión de progenitores multipotenciales. En este trabajo, emplean poblaciones de CMHs altamente purificadas (Lin-CD34-CD48-Sca1+cKit+CD150+), distinguibles de los progenitores multipotenciales. Así mismo, emplean dosis de NIC más controladas. Esto les permite determinar que el efecto a largo plazo de la activación de Notch resulta en la promoción de la salida de ciclo de las CMHs acompañado de una aceleración de la diferenciación, preferencial a linfocitos T, y un consiguiente agotamiento del pool de CMH-LT (Chiang, Shestova et al. 2013). Nuestros datos están más en consonancia con este trabajo. Así, hemos observado que la expresión de SCL-NIC en CMHs adultas induce una deficiente repoblación a largo plazo, indicando una pérdida de CMHs con capacidad de autorenovación (Figuras 25, 27 y 29), posiblemente relacionados con una pérdida de quiescencia, consistente con los estudios de Chiang et al.

También observamos que el grado de deficiencia en repoblación, presenta ciertas variaciones dependiendo del ensayo realizado. Las CMHs adultas están normalmente

en estado quiescente y el estrés, incluyendo el propio proceso de trasplante, induce su entrada en ciclo (Nilsson, Dooner et al. 1997). La demanda de proliferación intensa, se pone de manifiesto en trasplantes en dilución límite, o en trasplantes a largo tiempo. Cuando las CMHs de transgénicos SCL-NIC se trasplantan en cantidades saturantes, no se observan los déficits funcionales de forma tan acentuada. Así, animales trasplantados con 0.25×10^6 (según estudios previos conteniendo 1-4 CMHs) de células silvestres presentan una repoblación 5-10% de los animales trasplantados mientras que no se obtiene ningún animal repoblado con nuestras células NIC (Figura 27). Sin embargo, a dosis saturantes ($5-1 \times 10^6$ células totales de médula) la diferencia en porcentaje de animales es menos aparente reduciéndose de 70% de animales repoblados con células control, a un 30 % con células NIC (Figura 27). Las condiciones de estrés proliferativo pueden por tanto ser un factor determinante en la observación del fenotipo en trasplantes como otros autores han publicado (Lacombe, Herblot et al. 2010). Este razonamiento también estaría en línea con la casi ausencia de fenotipo en los ratones transgénicos SCL-NIC. Su estatus homeostático no obliga a las células a entrar en ciclo y por tanto no genera un fenotipo (Figura 22 y 23), excepto por la disminución en linfocitos B.

Por otro lado, el estudio de repoblación a corto plazo muestra que las células NIC presentan un incremento en lin- c-kit+ así como incremento en células hematopoyéticas T y mieloides (Figura 32). Estos datos son consistentes con los publicados por el grupo de W Pear (Chiang, Shestova et al. 2013), donde analizando el ciclo celular muestran que la activación de Notch induce una salida de ciclo celular acompañada de incremento de células c-kit+. En contraste con nuestro resultados, donde obtenemos un incremento de diferenciación tanto mieloide como de células T, en el trabajo de Pear et al, se observa una diferenciación preferencial hacia linfocitos T acompañada de una disminución de células mieloides. Una causa de esta diferencia podría estar relacionada con el sistema experimental de trasplante y por tanto el microambiente con al que se enfrentan las células trasplantadas. En nuestro caso, el trasplante se realiza en recién nacidos, mientras que en el otro trabajo emplean trasplantes en adultos irradiados. El sistema de recién nacido ofrece en general un microambiente más permisivo al injerto, diferenciación y expansión de diferentes poblaciones (Yoder and Hiatt 1997). Otra diferencia con el trabajo del grupo de W Pear, es la composición de las células donantes empleadas. Nosotros hemos trasplantado células de médula ósea total mientras que en el trabajo de Pear et al.,

emplean poblaciones de CMHs altamente purificadas. Por tanto, no podemos excluir que en nuestro caso, las células con marcador donantes mieloides provengan directamente de la proliferación de progenitores mieloides que también expresan el vector SCL-NIC (Sanchez, Bockamp et al. 2001; Silberstein, Sanchez et al. 2005), y no de la diferenciación de CMHs. Sin embargo, esta alternativa no está clara, teniendo en cuenta que en el grupo de Aifantis y colaboradores (Klinakis, Lobry et al. 2011), muestran que la activación ectópica de Notch1 en CMH/CPH empleando ratones *Ef1 α 1-Notch1ICMx1-cre+* inducen la supresión de genes mieloides-específicos. Por tanto, la realización de más experimentos con poblaciones de CMH altamente purificadas de ratones SCL-NIC y análisis transcripcional ayudaría a aclarar los puntos expuestos.

En resumen, en nuestro caso observamos a corto plazo, un incremento en todos los linajes celulares incluyendo células c-kit+. Este comportamiento sería consistente con la hipótesis de que la activación de Notch en CMHs, induce su proliferación y diferenciación produciendo, a la larga, agotamiento y extinción. Además, los niveles incrementados de Notch producen un incremento de células c-kit +. Aún no conocemos que tipo de CMH o progenitor es el que incrementa pero probablemente estas células se mantienen en estado indiferenciado (figura 64). Como resultado del agotamiento de algunas CMHs y del estado quiescente del resto, el porcentaje de animales repoblados a largo plazo decrece.

3- INFLUENCIA DEL NICHOS EN RATONES SCL-NIC.

Los transgénicos SCL-NIC son prácticamente normales, excepto por la disminución en linfocitos B. No presentan un incremento en progenitores Lin-kit+. Tampoco presentan un fenotipo leucémico T como sucede en modelos que emplean vectores de expresión víricos con fragmentos NIC no atenuados (Stier, Cheng et al. 2002), ni letalidad embrionaria (Tang, Bai et al. 2013). Esta casi ausencia de fenotipo contrasta con el incremento de células c-kit+ observado en trasplantes a corto plazo. Nosotros favorecemos la idea de que esta normalidad está relacionada con un efecto compensatorio de activación en el nicho (Kawamata, Du et al. 2002). Un factor determinante en el comportamiento de las CMHs está constituido por el microambiente o nicho que les rodea. Las células que componen el nicho de medula ósea incluyen los

osteoblastos, las células endoteliales pericitos, células mesenquimales y la propias células hematopoyéticas. Los osteoblastos están implicados en mantener la quiescencia de las CMHs mientras que el endotelio se considera que favorecen la entrada en ciclo (Morrison and Spradling 2008). En los transgénicos SCL-NIC, se detectan transcritos NIC tanto en células progenitoras kit⁺ (Lin-cKit⁺CD45⁺) como en células estromales, endoteliales (Lin-CD31⁺CD45⁻) y no endoteliales (Lin-CD31⁻CD45⁻) (Figura 18) en consonancia con el ya descrita patrón de expresión del vector SCL-3'Enh en osteoblastos, endotelio sinusoidal y progenitores hematopoyéticos (Sanchez, Gottgens et al. 1999; Sanchez, Bockamp et al. 2001; Garcia-Ortega, Canete et al. 2010). Además, cuando se trasplantan las células de medula de ratones SCL-NIC a receptores SCL-NIC, hay una normal repoblación de las células SCL-NIC y las CMH siguen manteniendo su actividad a largo plazo mientras que en los trasplantes de donantes SCL-NIC en animales silvestres las CMH donantes desaparecen (Figura 34). Estos datos sugieren una función activa del nicho de ratones SCL-NIC en el mantenimiento de la homeostasis. Posiblemente cuando en el compartimento de células de nicho y células progenitoras hematopoyéticas se produce una activación simultánea, los efectos son compensados. Por lo tanto la descoordinación de la activación de Notch entre ambos compartimentos sería la causante de los efectos observados. Para demostrar este punto se requieren mutantes específicos de linajes celulares y el trabajo de algunos grupos lo han conseguido. Así, el trabajo del grupo de Maeda y colaboradores muestra que mutantes para LRF presentan un incremento de ligando Dlt4 en eritroblastos de medula ósea, lo que conlleva a una activación de la señalización Notch y depleción de CMH-LT (Lee, Maeda et al. 2013). Por otro lado el grupo de Rafii y col consiguen la desaparición de CHM funcionales eliminando el ligando Jag1 de endotelio empleando el vector Vecad-Cre. Los resultados de este trabajo muestran una profunda deficiencia en hematopoyesis con, entrada en ciclo de las CMH y agotamiento prematuro (Poulos, Guo et al. 2013). En ambos casos, tanto el incremento de un ligando como la anulación de otro, causarían desequilibrios en la activación de Notch que determinarían la desaparición de las CMHs. Por otra parte el trabajo de Pear et al usa un promotor ubicuo, ROSA-NIC y observa en los transgénicos directamente el mismo efecto que en los trasplantes, es decir un incremento de progenitores kit⁺ y una depleción de CMH a largo plazo. Considerando que la expresión del ROSA-NIC es ubicuo, según la hipótesis del efecto compensatorio, se esperaría una ausencia de fenotipo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la inducción de NIC emplean ip:IC que es un inductor de stress de ciclo

celular (Essers, Offner et al. 2009), y el efecto puede sobreponerse a la compensación de nicho. En nuestra opinión, creemos que los datos presentados refuerzan el importante papel que la modulación de la ruta de Notch en células de nicho tiene sobre la homeostasis de CMH y su función a través de efectos compensatorios entre ambos compartimentos celulares. Más estudios son necesarios para aclarar este punto e intentar coordinar con otras serie de estudios que apuntan a la ausencia de función de Notch en el mantenimiento de la homeostasis de CMH (Maillard, Koch et al. 2008).

4-CASCADA DE ACCIÓN DE NOTCH ACTIVADO.

Se sabe que la ruta de señalización Notch1 ejerce diferentes funciones en distintos sistemas del organismo, como son el vascular, hematopoyético, el nervioso y el muscular. En cada sistema, Notch ejerce su acción de forma directa o indirecta mediante mecanismos de activación/inhibición e implicando a numerosos genes. Los genes estudiados en este trabajo se seleccionaron por su relación con el sistema hematopoyético y las células madre hematopoyéticas. Uno de los genes diana de Notch es GATA 2 (Robert-Moreno, Espinosa et al. 2005), que observamos esta incrementado en la CMHs adultas de médula.

GATA 2, miembro de la familia de factores de transcripción GATA (Merika and Orkin 1993). Los embriones deficientes en GATA2 son anémicos, presentan menos células eritroides primitivas y progenitores hematopoyéticos, y mueren a día 10.5, que es el momento en que las CMHs comienzan la expansión (Tsai, Keller et al. 1994). En 2004, Dzierzak et al., publicaron en JEM un artículo en el que estudiaban el efecto de una reducción parcial del gen sobre las CMHs empleando ratones GATA-2 ^{+/-}, en esta publicación describen como una reducción en los niveles de GATA-2 produce una reducción en el número de progenitores hematopoyéticos en los embriones, especialmente en la región de la aorta gónada mesonefros (AGM), y también tienen reducida su capacidad de repoblación, aunque no afecta al saco vitelino o al hígado fetal. Sin embargo, en la medula ósea adulta el número de progenitores es normal, aunque se muestran defectuosos en ensayos de cotrasplante. Resultados de otros grupos han puesto de manifiesto que, en ratón la sobre xpresión de GATA2 en medula ósea bloquea la hematopoyesis (Persons, Allay et al. 1999), fenotipo similar al obtenido en medulas de mutantes de GATA2 (Rodrigues, Janzen et al. 2005)

Ciertamente otros casos se han dado donde el exceso o falta de función de un factor de transcripción presentan efectos similares. Sin embargo, los mecanismos de regulación pueden ser diferentes o depender entre otros de los niveles de factores regulados en el nicho (Cui, Ma et al. 2006). Es interesante mencionar que estudios recientes realizados con células de cordón umbilical humano muestran que la sobre expresión de GATA2 inhibe la proliferación y la entrada en ciclo de progenitores y CMH, es decir mantiene las células en G₀. La consecuencia sobre las CMH es que también se reduce su capacidad de repoblación (sin afectar al homing o anidamiento (Tipping, Pina et al. 2009). Esto contrastaría con la de la que la activación de Notch provoca, entrada en ciclo y agotamiento de CMH. Más estudios son necesarios para determinar si el efecto en células humanas y de ratón de Notch se media a través de GATA2 y por los mismos mecanismos.

5-LAS CÉLULAS FETALES SON REFRACTARIAS A LA ACTIVACIÓN MEDIADA POR SCL-NIC: QUIESCENCIA, AUTO RENOVACIÓN Y EPIGENÉTICA.

Nuestros datos muestran que las células fetales son refractarias a la acción de Notch. Para demostrar que es una característica fetal general, el análisis se ha realizado en células c-kit⁺ procedentes de dos fuentes diferentes, el hígado fetal y la medula ósea del recién nacido. Ensayos de trasplantes competitivos con células c-kit⁺ muestran que la presencia de NIC no altera la capacidad de repoblación a largo plazo de las células de naturaleza fetal, pero inhibe las de adulto (Figura 39). Es más, aunque NIC se detecta en las células fetales kit⁺, estas no presentan incrementados los niveles de genes diana de Notch, GATA2, Hes1 o Notch1. Sin embargo, cuando sus descendientes kit⁺ se recuperan de animales repoblados a largo plazo en trasplantes secundarios, estos progenitores c-kit⁺ ya se comportan como células adultas, es decir, responden a NIC incrementando los niveles de genes diana y además pierden la capacidad de repoblación. Es decir, con el tiempo recuperan las propiedades de CMH adulta. Por tanto junto con las características propias del estadio fetal que incluyen alta auto renovación, estado cíclico, pro diferenciación mieloide y programas específicos de diferenciación linfóide (Bowie, Kent et al. 2007), podemos añadir la propiedad de ser refractarias a la activación de Notch1.

Por tanto, la activación de Notch1 con nuestra construcción transgénica tiene diferentes efectos sobre las células madre hematopoyéticas fetales y adultas (figura 64).

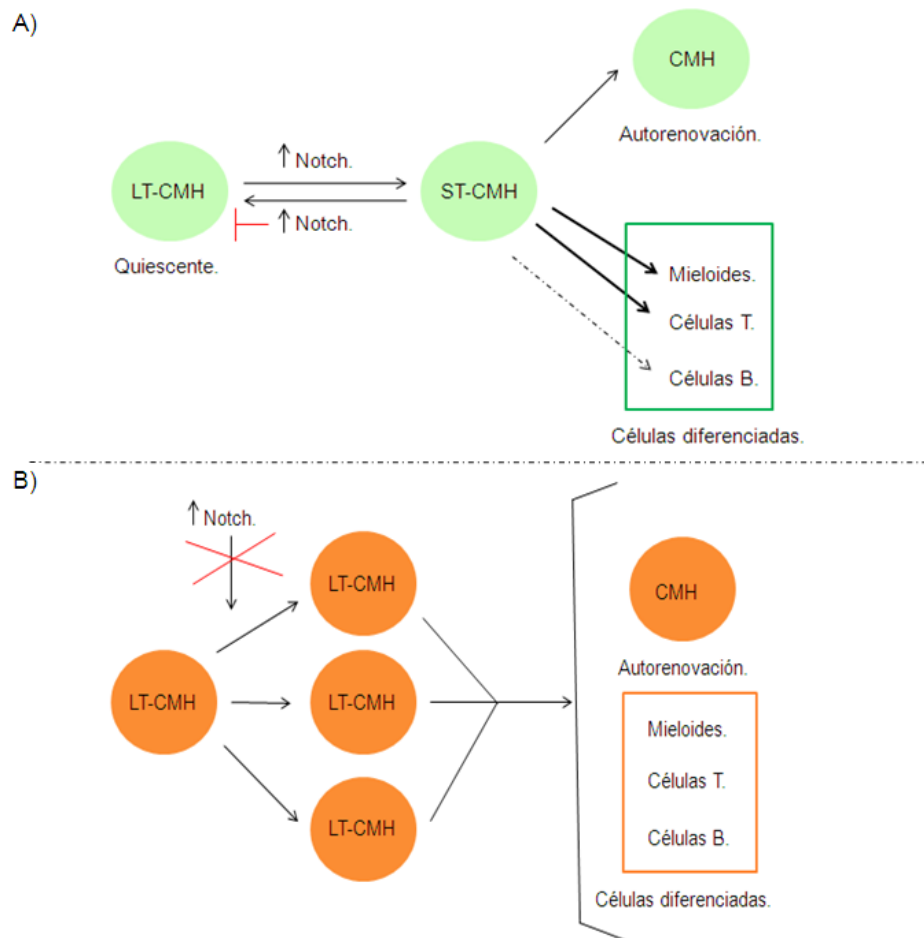


FIGURA 64. Esquema del efecto de SCL-NIC sobre las células madre hematopoyéticas adultas y fetales. A) El incremento de los niveles de Notch en CMHs de médula ósea adulta fuerza su diferenciación a linaje mieloide y células T en detrimento de las células B. Esta diferenciación incrementada puede dar lugar a que las células se agoten y se extingan, lo que explica el hecho de que encontremos menos animales repoblados cuando se emplean estas células en trasplantes. Por otro lado, el incremento de Notch parece incrementar los niveles de células c-kit⁺, dato consistente con estudios previos (Radtke, Wilson et al. 1999). B) El incremento de los niveles de Notch en CMHs fetales no altera su funcionalidad. Las CMHs fetales están en estado proliferativo, y pueden diferenciarse normalmente a todos los linajes. Parece que Notch1 no puede interferir en estos procesos.

¿Por qué las células fetales, que expresan Notch (figura 47), son refractarias a la activación de Notch1? Teniendo en cuenta que nuestros datos muestran que es una característica intrínseca fetal que cambia con el tiempo de desarrollo, podría pensarse que modificaciones epigenéticas podrían estar involucradas, es decir modificaciones permanentes de la cromatina que hacen que cambie la regulación génica, un proceso que sucede durante el desarrollo embrionario en general (Reik, Dean et al. 2001). Cabe destacar que diversos trabajos han puesto de manifiesto una relación del control de la alta capacidad de auto renovación de las CMH fetales y modificaciones epigenéticas. Las células fetales mantienen una alta capacidad de auto renovación, con el tiempo tiene que adaptarse a las nuevas circunstancias del adulto donde se impone la quiescencia de las CMH, con el fin de preservar su excesiva diferenciación y probablemente su agotamiento. Diversos estudios han puesto de manifiesto el papel de varias moléculas en la regulación de la auto renovación de CMH fetales, que no afectan a CMHs adultas. Entre ellas, se encuentra Sox17 (Kim, Saunders et al. 2007), Lin28 (Yuan, Nguyen et al. 2012), Ezh2 (Mochizuki-Kashio, Mishima et al. 2011) o C/EBPa (Ye, Zhang et al. 2013). El mecanismo de acción de algunas de estas moléculas sobre la auto renovación, implica modificaciones epigenéticas. Así, se ha descrito que Lin28 induce el factor remodelador de cromatina Hmga2. Las CMHs mutantes para Hmga2 en hígado fetal no pueden repoblar a largo plazo, pierden su capacidad autoreplicativa. Sin embargo, Hmga2 no es necesario en las células de adulto (Copley, Babovic et al. 2013). Sería interesante determinar si algunas de las modificaciones de cromatina inducidas por Hmga2 involucran promotores de genes relacionados con la ruta de activación de Notch.

Otro modificador epigenético es el gen de la familia policom Ezh2. Los genes Ezh1 y Ezh2 están involucrados en silenciamiento génico a través de modificaciones de la cromatina. Los mutantes para Ezh2 mueren en estadio fetal con un fenotipo anémico mientras que no se afectan las CMHs del adulto. Las técnicas moleculares ponen de manifiesto que en estos mutantes los progenitores hematopoyéticos del hígado presentan disminución en trimetilación en histonas H3, H3K27me3, lo que conlleva a la represión de gran cantidad de genes. Es más, cuando los progenitores fetales son trasplantados se observa con el tiempo un incremento de la trimetilación de histonas H3K27me3 concomitantemente con su conversión en CMH adulta (Mochizuki-Kashio, Mishima et al. 2011). Sería igualmente de interés determinar si genes involucrados en señalización de Notch están modificados por este gen de forma diferencial en adultos y

embriones.

Es interesante resaltar que, dentro del sistema hematopoyético, se ha puesto de manifiesto el mecanismo de acción de las modificaciones epigenéticas y la regulación de la ruta de Notch. Así, en estudios sobre la función de Notch en progenitores de linfocitos T de estadio DN4, se ha observado que expresan altos niveles de Notch1, sin embargo, no se detecta un incremento de Hes1. ¿Cómo se consigue que el promotor de Hes1 sea insensible a la presencia de Notch1? Parece ser que el factor de transcripción mediador de la señalización Notch, RBPjk se encuentra “secuestrado” en el promotor de Ikaros, un regulador de linfocitos T y no está disponible para en el promotor de Hes1. La ventaja del promotor de Ikaros reside en las modificaciones epigenéticas que específicamente ocurren en linfocitos T DN4 (Kleinmann, Geimer Le Lay et al. 2008). Sería interesante determinar si mecanismos similares podrían mediar el estatus refractario a la señalización de Notch en las células fetales.

Aún no conocemos que característica de estas CMHs fetales, es la que hace que su funcionalidad no se vea afectada por la sobreexpresión de Notch1, pero podemos decir que está relacionado con la naturaleza fetal de las mismas, y que es un efecto autónomo celular que no tiene que ver con el nicho en el que se encuentran estas células. Una de las principales diferencias entre las CMHs fetales y las adultas, es que las primeras son proliferativas, mientras que las células adultas son quiescentes. Es posible que la activación de Notch en células quiescentes, les empuje a divisiones asimétricas, y no puedan retornar a su estado quiescente, es decir, con potencial de repoblación a largo plazo. Las células fetales están ya en ciclo, es decir, presentan divisiones simétricas continuas. Probablemente, Notch no afecte este proceso. pero una vez que las células consiguen entrar en la división asimétrica, ya no retornan y pierden, con el tiempo, su capacidad de reconstituir a largo plazo (LTR-CMH).

6. EFECTO DE LA DELECCIÓN DE NOTCH1 SOBRE LAS CMHS DEL HÍGADO FETAL.

El hígado fetal es el órgano hematopoyético principal antes del nacimiento. El proceso más importante que ocurre en esta localización, es que las CMHs sufren una rápida expansión incrementando su número (Bigas and Espinosa 2012). Si Notch afecta o no a este proceso aún no se conoce bien, por lo que resulta interesante el estudio de este punto.

Los resultados publicados hasta el momento con respecto a la inhibición de la ruta de señalización de Notch en ratones adultos, muestran resultados contradictorios que podrían estar relacionados con la estrategia seguida en cada uno de ellos. Así por ejemplo, Maillard et al, llevan a cabo una inhibición de toda la ruta de señalización mediante la expresión de una forma dominante negativa de la proteína Mastermind-like1 y/o la delección condicional del gen RBPJk. Ambas proteínas, actúan como coactivador y factor de transcripción respectivamente, formando un complejo de transcripción junto con el dominio intracelular del receptor Notch que activa la transcripción de los genes diana de esta ruta. El análisis de ratones mutantes, y los ensayos de repoblación con CMHs indican que no existen deficiencias en la funcionalidad de las células madre y progenitores hematopoyéticos, aunque observaron una disminución en la producción de células mieloides. Por otro lado, trabajos realizados en el grupo de Aifantis et al (Klinakis, Lobry et al. 2011), llevaron a cabo una delección condicional del gen NCSTN, que regula la expresión de Nicastrina, una γ -secretasa que forma parte del complejo γ -SE, indispensable para el procesamiento del receptor Notch y, por tanto, para una señalización efectiva. También lleva a cabo una doble delección condicional de los genes Notch1 y 2, puesto que de los cuatro receptores Notch presentes en ratón, sólo éstos se expresan en CMHs. El resultado que obtiene es opuesto al de Maillard et al, dado que se induce una diferenciación mieloide en células madre hematopoyéticas, que progresa a una leucemia mieloide letal. Notch, por tanto, actuaría como un supresor de tumores.

En nuestro caso, para poder conseguir una delección condicional del gen Notch1 a nivel embrionario, se utilizó el sistema de la recombinasa Cre inducible por tamoxifeno, bajo la regulación del vector SCL-3'Enh. En los trabajos mencionados anteriormente, emplean un sistema diferente para conseguir la delección condicional. Maillard emplea

el sistema Mx-Cre inducible por Poly(I:C), con transducción retroviral y los elementos de expresión del locus ROSA; mientras que Aifantis utilizó también el sistema Mx-Cre y el sistema Vav-Cre, donde Cre se produce exclusivamente en las células hematopoyéticas, sin necesidad de inducción exógena para la delección tanto de la Nicastrina, como de los receptores Notch1 y 2, obteniendo en ambos casos resultados similares.

Por tanto, debemos tener en cuenta la variedad en los mecanismos utilizados para conseguir la delección condicional de Notch, ya que presentan distinta eficiencia a la hora de conseguir una recombinación específica y, por tanto, pueden resultar problemáticos a la hora de extrapolar los resultados.

Es muy importante realizar, en nuestro sistema, estudios sobre la eficiencia de la recombinación de los loci R26R-YFPlox y Notch1lox, mediada por el vector SCL-CreER^T. Mediante citometría de flujo, se observó que el sistema conseguía marcar (obtención de células YFP+), a un 11,3% de las células de hígado fetal total de embriones silvestres, de las cuales la mitad eran progenitores lin- c-kit+ (figura 50). Este resultado fue mayor al obtenido por Gothert (Gothert, Gustin et al. 2004), el cual obtuvo un valor medio de 1% de células YFP+ dentro dicha población. Hay que tener en cuenta que en su protocolo de tratamiento con tamoxifeno utiliza una dosis menor que la utilizada en nuestro estudio (2mg/ml), y un día más de inyección (E9-0,5mg, E10-1mg, E11-2mg). Esta interpretación es acorde con lo ya publicado con Hayashi (Hayashi and McMahon 2002), donde demuestra que una dosis mayor de tamoxifeno, se correlaciona con un nivel mayor de recombinación y, por tanto, un mayor porcentaje de células marcadas. Por tanto, el sistema tiene limitaciones, ya que induce recombinación del locus control ROSA-YFP en el 50% de las células progenitoras. Igualmente, se comprobó la eficiencia de recombinación del locus Notch1. Genéticamente, se observa un alto grado de recombinación en los progenitores c-kit+ y no se observa en la población c-kit-. Por tanto, la recombinación es específica pero no 100% efectiva (figura 53). Como consecuencia, comprobamos que los niveles de Notch1 en progenitores c-kit+ de mutantes condicionales no están totalmente suprimidos (Figura 54). Por lo tanto, es importante tener en cuenta para los ensayos funcionales, que el sistema presenta un alto grado de delección de Notch1, pero ésta no es completa.

En los embriones N1 mutantes, se observa una disminución significativa en el número de progenitores c-kit⁺ y progenitores mieloides Mac1⁺. Esta disminución podría deberse a un menor aporte o entrada de progenitores c-kit⁺ en el hígado, ya que la inyección de tamoxifeno se lleva a cabo en los estadios E10-11, y la determinación de CMHs a partir del endotelio, en el AGM, se produce en los estadios E10-12, y está afectada por la falta de función de Notch1 (Kumano, Chiba et al. 2003). Sin embargo, no es fácil evitar la etapa de determinación de CMHs, ya que si se inyecta más tarde, disminuiría el número de células madre mutantes para Notch1 (células recombinadas), debido a que el tamoxifeno tarda, aproximadamente 12 horas en alcanzar un pico de actuación. Otra explicación a esta disminución significativa en los progenitores c-kit⁺ podría deberse a un defecto en la capacidad de proliferación de dichos progenitores, sin embargo, el porcentaje de c-kit⁺ dentro de la población YFP⁺ es parecido en los embriones silvestres y mutantes, lo que podría indicar que la capacidad de proliferación de progenitores c-kit⁺ no está afectada por la falta de función de Notch. Otra observación importante, fue una disminución en el porcentaje de células eritroides Ter119⁺ dentro de la población YFP⁺ de embriones mutantes respecto a los silvestres, lo que podría indicar un defecto en la capacidad de diferenciación de las células c-kit⁺ hacia el linaje eritroide, o un defecto en la capacidad de proliferación de los eritroblastos como consecuencia de la falta de función de Notch1. De hecho, los ensayos de CFU-C in vitro, muestran un incremento de colonia en células c-kit⁺ YFP⁺ comparado con el control interno de células kit⁺YFP⁻ procedentes de hígado fetal mutante (Figura 56). En paralelo, se ha determinado que los transcritos de Notch1 presentan una disminución en las células c-kit⁺ YFP⁺ en comparación con el control interno c-kit⁺YFP⁻ (Figura 54), ambas derivados de mutantes condicionales. Este dato, junto con la disminución de células Ter119 en la fracción YFP⁺, sugeriría que la falta de función de Notch1 bloquea la diferenciación de progenitores en el hígado fetal de mutantes condicionales. Respecto a este último resultado, Aifantis (Klinakis, Lobry et al. 2011), observó en el análisis de los ratones mutantes para la actividad de Notch, una disminución en el número de progenitores de megacariocitos y eritrocitos, y un aumento en el número de células totales. Más experimentos son necesarios para confirmar el efecto específico sobre las diversas poblaciones mieloides.

Por último, para estudiar la funcionalidad de las CMHs, se realizó un análisis de trasplante en el cual se transfirió hígado fetal de embriones mutantes y silvestres, a receptores recién nacidos, analizando la capacidad de injerto a las 4 semanas (corto

plazo). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de contribución de células donantes YFP+ a los linajes B, T o mieloides. En el análisis de las quimeras a largo plazo, se observó un descenso significativo en el porcentaje de células T en bazo, médula y sangre, lo cual se corresponde con un efecto de la falta de Notch ya publicado previamente (Bigas and Espinosa 2012), aunque este defecto no se observó en el timo. En médula y bazo, sólo el nivel de CD8 está significativamente reducido, mientras que en la sangre están reducidos CD4 y CD8, lo que podría suponer que Notch1 es especialmente relevante para el desarrollo de este linaje, tal y como ya han mostrado otros autores (Dervovic, Liang et al. 2013). El hecho de que la delección de Notch1 no afecte a la diferenciación de linfocitos T en el timo, contrasta con publicaciones anteriores donde se muestra un profundo defecto de linfocitos T en mutantes inducidos durante la vida adulta Mx-cre/Notch1 o CD4-cre/Notch (Radtke, Wilson et al. 1999; Wilson, MacDonald et al. 2001; Sambandam, Maillard et al. 2005). En principio se podría esperar que, por un proceso de competición de los linfocitos T mutantes con los progenitores T que no han sufrido recombinación del locus Notch, estos repoblarían y se expandirían en el timo del receptor. Sin embargo, los datos que muestran la ausencia de producción de Notch1 en el timo repoblado con células donantes indicarían que la diferenciación T se produce en ausencia de Notch1 (Figura 62). Esta diferencia está probablemente relacionada con el vector de expresión SCL-3'Enh-Cre y el tiempo de inducción con tamoxifeno empleado en nuestro trabajo, en momentos tempranos del desarrollo. Hay que tener en cuenta que también los linfocitos T presentan programas de diferenciación diferentes durante la vida fetal y adulta (Ikuta, Kina et al. 1990). Durante la vida fetal, los progenitores T se generan en el hígado y migran al timo, mientras que durante la vida adulta, los progenitores T se generan en la médula ósea. Además en nuestro sistema experimental, los primeros progenitores que llegan al timo proceden de hígado y son trasplantados en recién nacido, que presentan un timo muy inmaduro, similar al fetal (Sanchez, Muench et al. 1994). En los trabajos del grupo de Radtke et al, inducen mutantes condicionales durante la vida adulta. Y los trasplantes se realizan en adultos irradiados. De hecho, las deficiencias en linfocitos T que observamos en trasplantes a largo plazo en órganos periféricos de animales trasplantados con células de hígado fetal mutantes condicionales Notch1, estarían en consonancia con defectos en la generación de linfocitos T en la vida postnatal.

En resumen, no es fácil interpretar los datos sobre el efecto de la falta de función de Notch1 en células fetales. Nuestros datos *in vitro* sobre el efecto de la delección de Notch1 en células fetales, sugieren que podría inducir la expansión de progenitores mieloides e interferir con la diferenciación eritroide, similar al efecto en células madre y progenitores hematopoyéticos de adulto (Klinakis, Lobry et al. 2011). Sin embargo, los estudios de trasplante indican que la diferenciación mieloide y linfoide B en ausencia de Notch1 no parece estar afectada, coincidiendo con los trabajos de Maillar et al, mientras que la población de linfocitos T si se ve afectada.

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES.

1. La activación de Notch1 en las células madre hematopoyéticas adultas, induce una pérdida de su capacidad de repoblación a largo plazo. A corto plazo, se produce una expansión de progenitores c-kit y de células maduras, lo que sugiere una aceleración en la diferenciación y posible agotamiento de células madre hematopoyéticas inducido por la activación de Notch1.
2. El trasplante de células madre hematopoyéticas SCL-NIC adultas en receptores SCL-NIC, recupera la capacidad de repoblación de las células donantes. La acción de la activación de Notch1, parece estar mediada por la interacción con las células de nicho y por la compensación de niveles de activación de Notch1 entre las células madre hematopoyéticas y el nicho.
3. Las células madre hematopoyéticas fetales, tanto de hígado fetal como de médula ósea de recién nacido, no se ven afectadas por la acción del SCL-NIC. Esta falta de respuesta puede asociarse a su naturaleza fetal, ya que cuando estas células adquieren las características de célula madre hematopoyética adulta y se emplean en trasplantes secundarios, pierden su capacidad de repoblación.
4. Las células madre hematopoyéticas de hígado fetal mutantes condicionales para Notch1, repueblan el sistema hematopoyético a largo plazo, aunque la repoblación de células T está disminuida en sangre, médula ósea y bazo.

BIBLIOGRAFIA.

(

- Acar, M., H. Jafar-Nejad, et al. (2008). "Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling." Cell 132(2): 247-258.
- Andersson, E. R., R. Sandberg, et al. "Notch signaling: simplicity in design, versatility in function." Development 138(17): 3593-3612.
- Appel, B., L. A. Givan, et al. (2001). "Delta-Notch signaling and lateral inhibition in zebrafish spinal cord development." BMC Dev Biol 1: 13.
- Askenasy, N. and D. L. Farkas (2003). "In vivo imaging studies of the effect of recipient conditioning, donor cell phenotype and antigen disparity on homing of haematopoietic cells to the bone marrow." Br J Haematol 120(3): 505-515.
- Aster, J. C., L. Xu, et al. (2000). "Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1." Mol Cell Biol 20(20): 7505-7515.
- Baena, E., M. Ortiz, et al. (2007). "c-Myc is essential for hematopoietic stem cell differentiation and regulates Lin(-)Sca-1(+)c-Kit(-) cell generation through p21." Exp Hematol 35(9): 1333-1343.
- Begley, C. G. and A. R. Green (1999). "The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator." Blood 93(9): 2760-2770.
- Benz, C., M. R. Copley, et al. "Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs." Cell Stem Cell 10(3): 273-283.
- Bertrand, J. Y., S. Giroux, et al. (2005). "Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin." Proc Natl Acad Sci U S A 102(1): 134-139.
- Bigas, A. and L. Espinosa (2012). "Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be." Blood 119(14): 3226-3235.
- Blank, U., G. Karlsson, et al. (2008). "Signaling pathways governing stem-cell fate." Blood 111(2): 492-503.
- Bloor, A. J., M. J. Sanchez, et al. (2002). "The role of the stem cell leukemia (SCL) gene in hematopoietic and endothelial lineage specification." J Hematother Stem Cell Res 11(2): 195-206.
- Boisset, J. C., W. van Cappellen, et al. (2010). "In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium." Nature 464(7285): 116-120.
- Bowie, M. B., D. G. Kent, et al. (2007). "Steel factor responsiveness regulates the high self-renewal phenotype of fetal hematopoietic stem cells." Blood 109(11): 5043-5048.
- Bowie, M. B., D. G. Kent, et al. (2007). "Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties." Proc Natl Acad Sci U S A 104(14): 5878-5882.
- Brou, C. (2009). "Intracellular trafficking of Notch receptors and ligands." Exp Cell Res 315(9): 1549-1555.
- Bussing, I., F. J. Slack, et al. (2008). "let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer." Trends Mol Med 14(9): 400-409.
- Butler, J. M., D. J. Nolan, et al. (2010). "Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell 6(3): 251-264.
- Calvi, L. M., G. B. Adams, et al. (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." Nature 425(6960): 841-846.
- Catlin, S. N., L. Busque, et al. (2011). "The replication rate of human hematopoietic stem cells in vivo." Blood 117(17): 4460-4466.

- Copley, M. R., S. Babovic, et al. (2013). "The Lin28b-let-7-Hmga2 axis determines the higher self-renewal potential of fetal haematopoietic stem cells." Nat Cell Biol 15(8): 916-925.
- Copley, M. R., P. A. Beer, et al. "Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage." Cell Stem Cell 10(6): 690-697.
- Copley, M. R., P. A. Beer, et al. (2012). "Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage." Cell Stem Cell 10(6): 690-697.
- Cui, H., J. Ma, et al. (2006). "Bmi-1 regulates the differentiation and clonogenic self-renewal of l-type neuroblastoma cells in a concentration-dependent manner." J Biol Chem 281(45): 34696-34704.
- Cui, Y. Z., H. Hisha, et al. (2002). "Optimal protocol for total body irradiation for allogeneic bone marrow transplantation in mice." Bone Marrow Transplant 30(12): 843-849.
- Cumano, A., C. Furlonger, et al. (1993). "Differentiation and characterization of B-cell precursors detected in the yolk sac and embryo body of embryos beginning at the 10- to 12-somite stage." Proc Natl Acad Sci U S A 90(14): 6429-6433.
- Chen, M. J., Y. Li, et al. (2011). "Erythroid/myeloid progenitors and hematopoietic stem cells originate from distinct populations of endothelial cells." Cell Stem Cell 9(6): 541-552.
- Chen, M. J., T. Yokomizo, et al. (2009). "Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter." Nature 457(7231): 887-891.
- Cheng, T., N. Rodrigues, et al. (2000). "Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1." Science 287(5459): 1804-1808.
- Chiang, M. Y., O. Shestova, et al. (2013). "Divergent effects of supraphysiologic Notch signals on leukemia stem cells and hematopoietic stem cells." Blood 121(6): 905-917.
- Chiba, S. (2006). "Notch signaling in stem cell systems." Stem Cells 24(11): 2437-2447.
- Chou, S. and H. F. Lodish "Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A 107(17): 7799-7804.
- Chow, L. M., Y. Tian, et al. (2006). "Inducible Cre recombinase activity in mouse cerebellar granule cell precursors and inner ear hair cells." Dev Dyn 235(11): 2991-2998.
- Christensen, J. L. and I. L. Weissman (2001). "Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A 98(25): 14541-14546.
- D'Souza, B., L. Meloty-Kapella, et al. (2010). "Canonical and non-canonical Notch ligands." Curr Top Dev Biol 92: 73-129.
- Dancis, J., V. Jansen, et al. (1977). "Treatment of hypoplastic anemia in mice with placental transplants." Blood 50(4): 663-670.
- de Andres, B., P. Gonzalo, et al. (2002). "The first 3 days of B-cell development in the mouse embryo." Blood 100(12): 4074-4081.
- Dekel, B., S. Metsuyanin, et al. (2008). "Organ-injury-induced reactivation of hemangioblastic precursor cells." Leukemia 22(1): 103-113.
- Delaney, C., S. Heimfeld, et al. (2010). "Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution." Nat Med 16(2): 232-236.
- Dervovic, D. D., H. C. Liang, et al. (2013). "Cellular and molecular requirements for the selection of in vitro-generated CD8 T cells reveal a role for Notch." J Immunol 191(4): 1704-1715.
- Di Guglielmo, G. M., C. Le Roy, et al. (2003). "Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover." Nat Cell Biol 5(5): 410-421.
- Diwan, B. A., L. M. Anderson, et al. (1997). "Proliferative lesions of oviduct and uterus in CD-1 mice exposed prenatally to tamoxifen." Carcinogenesis 18(10): 2009-2014.

- Dzierzak, E. and A. Medvinsky (2008). "The discovery of a source of adult hematopoietic cells in the embryo." Development 135(14): 2343-2346.
- Dzierzak, E. and N. A. Speck (2008). "Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells." Nat Immunol 9(2): 129-136.
- Espinosa, L., S. Cathelin, et al. (2010). "The Notch/Hes1 pathway sustains NF-kappaB activation through CYLD repression in T cell leukemia." Cancer Cell 18(3): 268-281.
- Espinosa, L., J. Ingles-Esteve, et al. (2003). "Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways." J Biol Chem 278(34): 32227-32235.
- Essers, M. A., S. Offner, et al. (2009). "IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo." Nature 458(7240): 904-908.
- Ferjentsik, Z., S. Hayashi, et al. (2009). "Notch is a critical component of the mouse somitogenesis oscillator and is essential for the formation of the somites." PLoS Genet 5(9): e1000662.
- Fernandez-Valdivia, R., H. Takeuchi, et al. (2011). "Regulation of mammalian Notch signaling and embryonic development by the protein O-glucosyltransferase Rumi." Development 138(10): 1925-1934.
- Feyerabend, T. B., G. Terszowski, et al. (2009). "Deletion of Notch1 converts pro-T cells to dendritic cells and promotes thymic B cells by cell-extrinsic and cell-intrinsic mechanisms." Immunity 30(1): 67-79.
- Fowlkes, B. J. and E. A. Robey (2002). "A reassessment of the effect of activated Notch1 on CD4 and CD8 T cell development." J Immunol 169(4): 1817-1821.
- Fryer, C. J., J. B. White, et al. (2004). "Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover." Mol Cell 16(4): 509-520.
- Garcia-Ortega, A. M., A. Canete, et al. (2010). "Enhanced hematovascular contribution of SCL 3' enhancer expressing fetal liver cells uncovers their potential to integrate in extramedullary adult niches." Stem Cells 28(1): 100-112.
- Gekas, C., F. Dieterlen-Lievre, et al. (2005). "The placenta is a niche for hematopoietic stem cells." Dev Cell 8(3): 365-375.
- Gering, M., A. R. Rodaway, et al. (1998). "The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm." EMBO J 17(14): 4029-4045.
- Ghosn, E. E., P. Sadate-Ngatchou, et al. (2011). "Distinct progenitors for B-1 and B-2 cells are present in adult mouse spleen." Proc Natl Acad Sci U S A 108(7): 2879-2884.
- Gierer, A. (1974). "Molecular models and combinatorial principles in cell differentiation and morphogenesis." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 38: 951-961.
- Godin, I., F. Dieterlen-Lievre, et al. (1995). "B-lymphoid potential in pre-liver mouse embryo." Semin Immunol 7(3): 131-141.
- Godin, I., J. A. Garcia-Porrero, et al. (1999). "Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites." J Exp Med 190(1): 43-52.
- Goldschneider, I., L. K. Gordon, et al. (1978). "Demonstration of Thy-1 antigen on pluripotent hemopoietic stem cells in the rat." J Exp Med 148(5): 1351-1366.
- Gothert, J. R., S. E. Gustin, et al. (2005). "In vivo fate-tracing studies using the Scl stem cell enhancer: embryonic hematopoietic stem cells significantly contribute to adult hematopoiesis." Blood 105(7): 2724-2732.
- Gothert, J. R., S. E. Gustin, et al. (2004). "Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium." Blood 104(6): 1769-1777.
- Guarani, V., G. Deflorian, et al. "Acetylation-dependent regulation of endothelial Notch signalling by the SIRT1 deacetylase." Nature 473(7346): 234-238.

- Guenechea, G., O. I. Gan, et al. (2001). "Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential." Nat Immunol 2(1): 75-82.
- Guiu, J., R. Shimizu, et al. "Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling." J Exp Med 210(1): 71-84.
- Guiu, J., R. Shimizu, et al. (2013). "Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling." J Exp Med 210(1): 71-84.
- Gustafsson, M. V., X. Zheng, et al. (2005). "Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state." Dev Cell 9(5): 617-628.
- Hadland, B. K., S. S. Huppert, et al. (2004). "A requirement for Notch1 distinguishes 2 phases of definitive hematopoiesis during development." Blood 104(10): 3097-3105.
- Hardy, R. R. and K. Hayakawa (1991). "A developmental switch in B lymphopoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A 88(24): 11550-11554.
- Harrison, D. E. (1980). "Competitive repopulation: a new assay for long-term stem cell functional capacity." Blood 55(1): 77-81.
- Harrison, D. E., C. T. Jordan, et al. (1993). "Primitive hemopoietic stem cells: direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations." Exp Hematol 21(2): 206-219.
- Hayashi, S. and A. P. McMahon (2002). "Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse." Dev Biol 244(2): 305-318.
- He, S., I. Kim, et al. "Sox17 expression confers self-renewal potential and fetal stem cell characteristics upon adult hematopoietic progenitors." Genes Dev 25(15): 1613-1627.
- He, S., I. Kim, et al. (2011). "Sox17 expression confers self-renewal potential and fetal stem cell characteristics upon adult hematopoietic progenitors." Genes Dev 25(15): 1613-1627.
- Heuss, S. F., D. Ndiaye-Lobry, et al. (2008). "The intracellular region of Notch ligands Dll1 and Dll3 regulates their trafficking and signaling activity." Proc Natl Acad Sci U S A 105(32): 11212-11217.
- Hock, H., E. Meade, et al. (2004). "Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival." Genes Dev 18(19): 2336-2341.
- Huang, H. and R. Auerbach (1993). "Identification and characterization of hematopoietic stem cells from the yolk sac of the early mouse embryo." Proc Natl Acad Sci U S A 90(21): 10110-10114.
- Hubbard, E. J., G. Wu, et al. (1997). "sel-10, a negative regulator of lin-12 activity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the CDC4 family of proteins." Genes Dev 11(23): 3182-3193.
- Ichikawa, M., T. Asai, et al. (2004). "Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis." Cell Cycle 3(6): 722-724.
- Ikuta, K., T. Kina, et al. (1990). "A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells." Cell 62(5): 863-874.
- Ikuta, K. and I. L. Weissman (1991). "The junctional modifications of a T cell receptor gamma chain are determined at the level of thymic precursors." J Exp Med 174(5): 1279-1282.
- Ikuta, K. and I. L. Weissman (1992). "Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation." Proc Natl Acad Sci U S A 89(4): 1502-1506.
- Indra, A. K., X. Warot, et al. (1999). "Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the

- tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases." Nucleic Acids Res 27(22): 4324-4327.
- Iso, T., L. Kedes, et al. (2003). "HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway." J Cell Physiol 194(3): 237-255.
- Itoh, M., C. H. Kim, et al. (2003). "Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta." Dev Cell 4(1): 67-82.
- Ivanova, N. B., J. T. Dimos, et al. (2002). "A stem cell molecular signature." Science 298(5593): 601-604.
- Ivanovs, A., S. Rybtsov, et al. (2011). "Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region." J Exp Med 208(12): 2417-2427.
- Iwasaki, H. and K. Akashi (2007). "Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell." Immunity 26(6): 726-740.
- Iwasaki, H., F. Arai, et al. (2010). "Endothelial protein C receptor-expressing hematopoietic stem cells reside in the perisinusoidal niche in fetal liver." Blood 116(4): 544-553.
- Jordan, V. C. (1984). "Biochemical pharmacology of antiestrogen action." Pharmacol Rev 36(4): 245-276.
- Kageyama, R., Y. Masamizu, et al. (2007). "Oscillator mechanism of Notch pathway in the segmentation clock." Dev Dyn 236(6): 1403-1409.
- Kageyama, R., T. Ohtsuka, et al. (2007). "The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis." Development 134(7): 1243-1251.
- Kageyama, R., T. Ohtsuka, et al. (2008). "Roles of Hes genes in neural development." Dev Growth Differ 50 Suppl 1: S97-103.
- Karanu, F. N., B. Murdoch, et al. (2000). "The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells." J Exp Med 192(9): 1365-1372.
- Kawamata, S., C. Du, et al. (2002). "Notch1 perturbation of hemopoiesis involves non-cell-autonomous modifications." J Immunol 168(4): 1738-1745.
- Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, et al. (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." Cell 121(7): 1109-1121.
- Kieusseian, A., P. Brunet de la Grange, et al. (2012). "Immature hematopoietic stem cells undergo maturation in the fetal liver." Development 139(19): 3521-3530.
- Kikuchi, K. and M. Kondo (2006). "Developmental switch of mouse hematopoietic stem cells from fetal to adult type occurs in bone marrow after birth." Proc Natl Acad Sci U S A 103(47): 17852-17857.
- Kim, I., T. L. Saunders, et al. (2007). "Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells." Cell 130(3): 470-483.
- Kim, I., O. H. Yilmaz, et al. (2005). "CD144 (VE-cadherin) is transiently expressed by fetal liver hematopoietic stem cells." Blood 106(3): 903-905.
- Kim, Y. W., B. K. Koo, et al. (2008). "Defective Notch activation in microenvironment leads to myeloproliferative disease." Blood 112(12): 4628-4638.
- Kleinmann, E., A. S. Geimer Le Lay, et al. (2008). "Ikaros represses the transcriptional response to Notch signaling in T-cell development." Mol Cell Biol 28(24): 7465-7475.
- Klinakis, A., C. Lobry, et al. (2011). "A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia." Nature 473(7346): 230-233.
- Koo, B. K., H. S. Lim, et al. (2005). "Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch." Development 132(15): 3459-3470.
- Kopan, R. and M. X. Ilagan (2009). "The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism." Cell 137(2): 216-233.

- Kopan, R. and D. L. Turner (1996). "The Notch pathway: democracy and aristocracy in the selection of cell fate." Curr Opin Neurobiol 6(5): 594-601.
- Kovall, R. A. and S. C. Blacklow "Mechanistic insights into Notch receptor signaling from structural and biochemical studies." Curr Top Dev Biol 92: 31-71.
- Kumano, K., S. Chiba, et al. (2003). "Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells." Immunity 18(5): 699-711.
- Kumano, K., S. Chiba, et al. (2001). "Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression." Blood 98(12): 3283-3289.
- Lacombe, J., S. Herblot, et al. (2010). "Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells." Blood 115(4): 792-803.
- Lam, L. T., C. Ronchini, et al. (2000). "Suppression of erythroid but not megakaryocytic differentiation of human K562 erythroleukemic cells by notch-1." J Biol Chem 275(26): 19676-19684.
- Le Bras, S., N. Loyer, et al. (2011). "The multiple facets of ubiquitination in the regulation of notch signaling pathway." Traffic 12(2): 149-161.
- Lee, S. U., M. Maeda, et al. (2013). "LRF-mediated Dll4 repression in erythroblasts is necessary for hematopoietic stem cell maintenance." Blood 121(6): 918-929.
- Lemischka, I. R., D. H. Raulet, et al. (1986). "Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells." Cell 45(6): 917-927.
- Liakhovitskaia, A., R. Gribi, et al. (2009). "Restoration of Runx1 expression in the Tie2 cell compartment rescues definitive hematopoietic stem cells and extends life of Runx1 knockout animals until birth." Stem Cells 27(7): 1616-1624.
- Liu, C. P. and R. Auerbach (1991). "Ontogeny of murine T cells: thymus-regulated development of T cell receptor-bearing cells derived from embryonic yolk sac." Eur J Immunol 21(8): 1849-1855.
- Liu, J., C. Sato, et al. (2010). "Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation." Curr Top Dev Biol 92: 367-409.
- Maillard, I., U. Koch, et al. (2008). "Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell 2(4): 356-366.
- Mancini, S. J., N. Mantei, et al. (2005). "Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation." Blood 105(6): 2340-2342.
- Matsuoka, S., Y. Ebihara, et al. (2001). "CD34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages." Blood 97(2): 419-425.
- McKenzie, J. L., O. I. Gan, et al. (2006). "Individual stem cells with highly variable proliferation and self-renewal properties comprise the human hematopoietic stem cell compartment." Nat Immunol 7(11): 1225-1233.
- Medvinsky, A. and E. Dzierzak (1996). "Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region." Cell 86(6): 897-906.
- Medvinsky, A., S. Rybtsov, et al. "Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions." Development 138(6): 1017-1031.
- Medvinsky, A., S. Rybtsov, et al. (2011). "Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions." Development 138(6): 1017-1031.
- Mendez-Ferrer, S., T. V. Michurina, et al. "Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche." Nature 466(7308): 829-834.
- Merika, M. and S. H. Orkin (1993). "DNA-binding specificity of GATA family transcription factors." Mol Cell Biol 13(7): 3999-4010.

- Metcalf, D. and M. A. Moore (1970). "Factors modifying stem cell proliferation of myelomonocytic leukemic cells in vitro and in vivo." J Natl Cancer Inst 44(4): 801-808.
- Micchelli, C. A., E. J. Rulifson, et al. (1997). "The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate." Development 124(8): 1485-1495.
- Miharada, K., G. Karlsson, et al. (2011). "Cripto regulates hematopoietic stem cells as a hypoxic-niche-related factor through cell surface receptor GRP78." Cell Stem Cell 9(4): 330-344.
- Miles, C., M. J. Sanchez, et al. (1997). "Expression of the Ly-6E.1 (Sca-1) transgene in adult hematopoietic stem cells and the developing mouse embryo." Development 124(2): 537-547.
- Milner, L. A. and A. Bigas (1999). "Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation." Blood 93(8): 2431-2448.
- Minegishi, N., J. Ohta, et al. (1999). "The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region." Blood 93(12): 4196-4207.
- Mochizuki-Kashio, M., Y. Mishima, et al. (2011). "Dependency on the polycomb gene *Ezh2* distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells." Blood 118(25): 6553-6561.
- Moore, M. A. (2012). "Waking up HSCs: a new role for E-selectin." Nat Med 18(11): 1613-1614.
- Moore, M. A. and D. Metcalf (1970). "Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo." Br J Haematol 18(3): 279-296.
- Morrison, S. J., H. D. Hemmati, et al. (1995). "The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A 92(22): 10302-10306.
- Morrison, S. J. and J. Kimble (2006). "Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer." Nature 441(7097): 1068-1074.
- Morrison, S. J., S. E. Perez, et al. (2000). "Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells." Cell 101(5): 499-510.
- Morrison, S. J. and A. C. Spradling (2008). "Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life." Cell 132(4): 598-611.
- Morrison, S. J. and I. L. Weissman (1994). "The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype." Immunity 1(8): 661-673.
- Muller, A. M. and E. A. Dzierzak (1993). "ES cells have only a limited lymphopoietic potential after adoptive transfer into mouse recipients." Development 118(4): 1343-1351.
- Muller, A. M., A. Medvinsky, et al. (1994). "Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo." Immunity 1(4): 291-301.
- Mumm, J. S. and R. Kopan (2000). "Notch signaling: from the outside in." Dev Biol 228(2): 151-165.
- Musse, A. A., L. Meloty-Kapella, et al. (2012). "Notch ligand endocytosis: mechanistic basis of signaling activity." Semin Cell Dev Biol 23(4): 429-436.
- Nichols, J. T., A. Miyamoto, et al. (2007). "Notch signaling--constantly on the move." Traffic 8(8): 959-969.
- Nilsson, S. K., M. S. Dooner, et al. (1997). "Synchronized cell-cycle induction of engrafting long-term repopulating stem cells." Blood 90(11): 4646-4650.

- Nilsson, S. K., H. M. Johnston, et al. (2001). "Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches." Blood 97(8): 2293-2299.
- North, T., T. L. Gu, et al. (1999). "Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters." Development 126(11): 2563-2575.
- Notta, F., C. G. Mullighan, et al. "Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells." Nature 469(7330): 362-367.
- Okada, S., H. Nakauchi, et al. (1992). "In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells." Blood 80(12): 3044-3050.
- Okajima, T., B. Reddy, et al. (2008). "Contributions of chaperone and glycosyltransferase activities of O-fucosyltransferase 1 to Notch signaling." BMC Biol 6: 1.
- Orford, K. W. and D. T. Scadden (2008). "Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation." Nat Rev Genet 9(2): 115-128.
- Oswald, F., U. Kostezka, et al. (2002). "SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway." EMBO J 21(20): 5417-5426.
- Ottersbach, K. and E. Dzierzak (2005). "The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region." Dev Cell 8(3): 377-387.
- Park, I. K., D. Qian, et al. (2003). "Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells." Nature 423(6937): 302-305.
- Parks, A. L., S. S. Huppert, et al. (1997). "The dynamics of neurogenic signalling underlying bristle development in *Drosophila melanogaster*." Mech Dev 63(1): 61-74.
- Patt, H. M. and M. A. Maloney (1972). "Bone formation and resorption as a requirement for marrow development." Proc Soc Exp Biol Med 140(1): 205-207.
- Patt, H. M. and M. A. Maloney (1975). "Bone marrow regeneration after local injury: a review." Exp Hematol 3(2): 135-148.
- Persons, D. A., J. A. Allay, et al. (1999). "Enforced expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis." Blood 93(2): 488-499.
- Phillips, R. L., R. E. Ernst, et al. (2000). "The genetic program of hematopoietic stem cells." Science 288(5471): 1635-1640.
- Pimanda, J. E., L. Silberstein, et al. (2006). "Transcriptional link between blood and bone: the stem cell leukemia gene and its +19 stem cell enhancer are active in bone cells." Mol Cell Biol 26(7): 2615-2625.
- Pina, C. and T. Enver (2007). "Differential contributions of haematopoietic stem cells to foetal and adult haematopoiesis: insights from functional analysis of transcriptional regulators." Oncogene 26(47): 6750-6765.
- Poulos, M. G., P. Guo, et al. "Endothelial Jagged-1 is necessary for homeostatic and regenerative hematopoiesis." Cell Rep 4(5): 1022-1034.
- Poulos, M. G., P. Guo, et al. (2013). "Endothelial Jagged-1 is necessary for homeostatic and regenerative hematopoiesis." Cell Rep 4(5): 1022-1034.
- Pui, J. C., D. Allman, et al. (1999). "Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination." Immunity 11(3): 299-308.
- Purton, L. E. and D. T. Scadden (2007). "Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays." Cell Stem Cell 1(3): 263-270.
- Radtke, F., N. Fasnacht, et al. (2010). "Notch signaling in the immune system." Immunity 32(1): 14-27.
- Radtke, F., A. Wilson, et al. (2005). "Notch signaling in hematopoiesis and lymphopoiesis: lessons from *Drosophila*." Bioessays 27(11): 1117-1128.
- Radtke, F., A. Wilson, et al. (1999). "Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1." Immunity 10(5): 547-558.

- Reik, W., W. Dean, et al. (2001). "Epigenetic reprogramming in mammalian development." Science 293(5532): 1089-1093.
- Robert-Moreno, A., L. Espinosa, et al. (2005). "RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells." Development 132(5): 1117-1126.
- Robert-Moreno, A., L. Espinosa, et al. (2007). "The notch pathway positively regulates programmed cell death during erythroid differentiation." Leukemia 21(7): 1496-1503.
- Robert-Moreno, A., J. Guiu, et al. (2008). "Impaired embryonic haematopoiesis yet normal arterial development in the absence of the Notch ligand Jagged1." EMBO J 27(13): 1886-1895.
- Robey, E., D. Chang, et al. (1996). "An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages." Cell 87(3): 483-492.
- Rodrigues, N. P., V. Janzen, et al. (2005). "Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis." Blood 106(2): 477-484.
- Rybtsov, S., M. Sobiesiak, et al. (2011). "Hierarchical organization and early hematopoietic specification of the developing HSC lineage in the AGM region." J Exp Med 208(6): 1305-1315.
- Sabin, F. R. (1916). "The Method of Growth of the Lymphatic System." Science 44(1127): 145-158.
- Sakata, T., H. Sakaguchi, et al. (2004). "Drosophila Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation." Curr Biol 14(24): 2228-2236.
- Sambandam, A., I. Maillard, et al. (2005). "Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors." Nat Immunol 6(7): 663-670.
- Samokhvalov, I. M., N. I. Samokhvalova, et al. (2007). "Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis." Nature 446(7139): 1056-1061.
- Sanchez, M., B. Gottgens, et al. (1999). "An SCL 3' enhancer targets developing endothelium together with embryonic and adult haematopoietic progenitors." Development 126(17): 3891-3904.
- Sanchez, M. J., E. O. Bockamp, et al. (2001). "Selective rescue of early haematopoietic progenitors in Scl(-/-) mice by expressing Scl under the control of a stem cell enhancer." Development 128(23): 4815-4827.
- Sanchez, M. J., A. Holmes, et al. (1996). "Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo." Immunity 5(6): 513-525.
- Sanchez, M. J., M. O. Muench, et al. (1994). "Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus." J Exp Med 180(2): 569-576.
- Sands, M. S. and J. E. Barker (1999). "Percutaneous intravenous injection in neonatal mice." Lab Anim Sci 49(3): 328-330.
- Satoh, Y., I. Matsumura, et al. (2004). "Roles for c-Myc in self-renewal of hematopoietic stem cells." J Biol Chem 279(24): 24986-24993.
- Schmitt, T. M., M. Ciofani, et al. (2004). "Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions." J Exp Med 200(4): 469-479.
- Schmitt, T. M. and J. C. Zuniga-Pflucker (2002). "Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro." Immunity 17(6): 749-756.
- Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." Blood Cells 4(1-2): 7-25.

- Schroeder, T. and U. Just (2000). "Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation." EMBO J 19(11): 2558-2568.
- Schroeder, T., H. Kohlhof, et al. (2003). "Notch signaling induces multilineage myeloid differentiation and up-regulates PU.1 expression." J Immunol 170(11): 5538-5548.
- Schroeter, E. H., J. A. Kisslinger, et al. (1998). "Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain." Nature 393(6683): 382-386.
- Schulz, C., E. Gomez Perdiguero, et al. (2012). "A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells." Science 336(6077): 86-90.
- Serrano, N., I. Cortegano, et al. "Megakaryocytes promote hepatoepithelial liver cell development in E11.5 mouse embryos by cell-to-cell contact and by vascular endothelial growth factor A signaling." Hepatology 56(5): 1934-1945.
- Silberstein, L., M. J. Sanchez, et al. (2005). "Transgenic analysis of the stem cell leukemia +19 stem cell enhancer in adult and embryonic hematopoietic and endothelial cells." Stem Cells 23(9): 1378-1388.
- Spangrude, G. J. and D. M. Brooks (1992). "Phenotypic analysis of mouse hematopoietic stem cells shows a Thy-1-negative subset." Blood 80(8): 1957-1964.
- Spangrude, G. J., D. M. Brooks, et al. (1995). "Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells: in vivo expansion of stem cell phenotype but not function." Blood 85(4): 1006-1016.
- Spangrude, G. J., S. Heimfeld, et al. (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." Science 241(4861): 58-62.
- Spangrude, G. J. and I. L. Weissman (1988). "Mature T cells generated from single thymic clones are phenotypically and functionally heterogeneous." J Immunol 141(6): 1877-1890.
- Srinivas, S., T. Watanabe, et al. (2001). "Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus." BMC Dev Biol 1: 4.
- Stanley, P. and T. Okajima (2010). "Roles of glycosylation in Notch signaling." Curr Top Dev Biol 92: 131-164.
- Stier, S., T. Cheng, et al. (2002). "Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome." Blood 99(7): 2369-2378.
- Szilvassy, S. J., R. K. Humphries, et al. (1990). "Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy." Proc Natl Acad Sci U S A 87(22): 8736-8740.
- Tamura, K., Y. Taniguchi, et al. (1995). "Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H)." Curr Biol 5(12): 1416-1423.
- Tang, Y., H. Bai, et al. (2013). "Notch1 activation in embryonic VE-cadherin populations selectively blocks hematopoietic stem cell generation and fetal liver hematopoiesis." Transgenic Res 22(2): 403-410.
- Tateya, T., I. Imayoshi, et al. (2011). "Cooperative functions of Hes/Hey genes in auditory hair cell and supporting cell development." Dev Biol 352(2): 329-340.
- Tian, J., L. Ling, et al. "Loss of CHSY1, a secreted FRINGE enzyme, causes syndromic brachydactyly in humans via increased NOTCH signaling." Am J Hum Genet 87(6): 768-778.
- Till, J. E. and C. E. Mc (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiat Res 14: 213-222.
- Till, J. E., S. Wilson, et al. (1970). "Repression of colony formation reversed by antiserum to mouse thymocytes." Science 169(3952): 1327-1329.

- Tipping, A. J., C. Pina, et al. (2009). "High GATA-2 expression inhibits human hematopoietic stem and progenitor cell function by effects on cell cycle." Blood 113(12): 2661-2672.
- Tomita, K., M. Hattori, et al. (1999). "The bHLH gene Hes1 is essential for expansion of early T cell precursors." Genes Dev 13(9): 1203-1210.
- Tsai, F. Y., G. Keller, et al. (1994). "An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2." Nature 371(6494): 221-226.
- Uchida, N. and I. L. Weissman (1992). "Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1^{lo} Lin⁻ Sca-1⁺ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow." J Exp Med 175(1): 175-184.
- Varnum-Finney, B., C. Brashem-Stein, et al. (2003). "Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability." Blood 101(5): 1784-1789.
- Varnum-Finney, B., L. E. Purton, et al. (1998). "The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells." Blood 91(11): 4084-4091.
- Varnum-Finney, B., L. Wu, et al. (2000). "Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of notch signaling." J Cell Sci 113 Pt 23: 4313-4318.
- Varnum-Finney, B., L. Xu, et al. (2000). "Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling." Nat Med 6(11): 1278-1281.
- Vasyutina, E., D. C. Lenhard, et al. (2007). "RBP-J (Rbpsi) is essential to maintain muscle progenitor cells and to generate satellite cells." Proc Natl Acad Sci U S A 104(11): 4443-4448.
- Venkatesh, D. A., K. S. Park, et al. (2008). "Cardiovascular and hematopoietic defects associated with Notch1 activation in embryonic Tie2-expressing populations." Circ Res 103(4): 423-431.
- Vintersten, K., C. Monetti, et al. (2004). "Mouse in red: red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals." Genesis 40(4): 241-246.
- Visan, I., J. S. Yuan, et al. (2006). "Regulation of intrathymic T-cell development by Lunatic Fringe- Notch1 interactions." Immunol Rev 209: 76-94.
- Visnjic, D., Z. Kalajzic, et al. (2004). "Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency." Blood 103(9): 3258-3264.
- Walkley, C. R., G. A. McArthur, et al. (2005). "Cell division and hematopoietic stem cells: not always exhausting." Cell Cycle 4(7): 893-896.
- Wang, X. D., C. C. Leow, et al. (2006). "Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation." Dev Biol 290(1): 66-80.
- Wendorff, A. A., U. Koch, et al. (2010). "Hes1 is a critical but context-dependent mediator of canonical Notch signaling in lymphocyte development and transformation." Immunity 33(5): 671-684.
- Weng, A. P., A. A. Ferrando, et al. (2004). "Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia." Science 306(5694): 269-271.
- Weng, A. P., J. M. Millholland, et al. (2006). "c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma." Genes Dev 20(15): 2096-2109.
- Wharton, K. A., B. Yedvobnick, et al. (1985). "opa: a novel family of transcribed repeats shared by the Notch locus and other developmentally regulated loci in D. melanogaster." Cell 40(1): 55-62.
- Wilkin, M. B., A. M. Carbery, et al. (2004). "Regulation of notch endosomal sorting and signaling by Drosophila Nedd4 family proteins." Curr Biol 14(24): 2237-2244.
- Wilson, A., H. R. MacDonald, et al. (2001). "Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus." J Exp Med 194(7): 1003-1012.

- Wilson, A., M. J. Murphy, et al. (2004). "c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation." Genes Dev 18(22): 2747-2763.
- Wilson, A. and A. Trumpp (2006). "Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches." Nat Rev Immunol 6(2): 93-106.
- Winkler, I. G., V. Barbier, et al. "Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance." Nat Med 18(11): 1651-1657.
- Wolfe, M. S. (2006). "The gamma-secretase complex: membrane-embedded proteolytic ensemble." Biochemistry 45(26): 7931-7939.
- Wolfer, A., T. Bakker, et al. (2001). "Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development." Nat Immunol 2(3): 235-241.
- Wu, G., S. Lyapina, et al. (2001). "SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation." Mol Cell Biol 21(21): 7403-7415.
- Yamamoto, N., K. Tanigaki, et al. (2003). "Notch/RBP-J signaling regulates epidermis/hair fate determination of hair follicular stem cells." Curr Biol 13(4): 333-338.
- Yang, L., D. Bryder, et al. (2005). "Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients." Blood 105(7): 2717-2723.
- Ye, M., H. Zhang, et al. (2013). "C/EBPα controls acquisition and maintenance of adult haematopoietic stem cell quiescence." Nat Cell Biol 15(4): 385-394.
- Yoder, M. C., J. G. Cumming, et al. (1996). "A novel method of myeloablation to enhance engraftment of adult bone marrow cells in newborn mice." Biol Blood Marrow Transplant 2(2): 59-67.
- Yoder, M. C. and K. Hiatt (1997). "Engraftment of embryonic hematopoietic cells in conditioned newborn recipients." Blood 89(6): 2176-2183.
- Yoon, M. J., B. K. Koo, et al. (2008). "Mind bomb-1 is essential for intraembryonic hematopoiesis in the aortic endothelium and the subaortic patches." Mol Cell Biol 28(15): 4794-4804.
- Yoshimoto, M., E. Montecino-Rodriguez, et al. "Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential." Proc Natl Acad Sci U S A 108(4): 1468-1473.
- Yuan, J., C. K. Nguyen, et al. "Lin28b reprograms adult bone marrow hematopoietic progenitors to mediate fetal-like lymphopoiesis." Science 335(6073): 1195-1200.
- Yuan, J., C. K. Nguyen, et al. (2012). "Lin28b reprograms adult bone marrow hematopoietic progenitors to mediate fetal-like lymphopoiesis." Science 335(6073): 1195-1200.
- Yuan, R., C. M. Astle, et al. (2005). "Genetic regulation of hematopoietic stem cell exhaustion during development and growth." Exp Hematol 33(2): 243-250.
- Zeigler, B. M., D. Sugiyama, et al. (2006). "The allantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-allantoic fusion, have hematopoietic potential." Development 133(21): 4183-4192.
- Zeng, H., R. Yucel, et al. (2004). "Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells." EMBO J 23(20): 4116-4125.
- Zhang, J., C. Niu, et al. (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." Nature 425(6960): 836-841.
- Zhang, N., Z. Fu, et al. (2010). "The asparaginyl hydroxylase factor inhibiting HIF-1α is an essential regulator of metabolism." Cell Metab 11(5): 364-378.
- Zong, Y., A. Panikkar, et al. (2009). "Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation." Development 136(10): 1727-1739.
- Zovein, A. C., J. J. Hofmann, et al. (2008). "Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell 3(6): 625-636.

Zovein, A. C., K. A. Turlo, et al. "Vascular remodeling of the vitelline artery initiates extravascular emergence of hematopoietic clusters." Blood 116(18): 3435-3444.

APENDICE.

LISTADO DE SOLUCIONES DE TRABAJO:

-Tampón Fosfato Salino (PBS):

- 137 mM NaCl.
- 2.7 mM KCl.
- 10 mM Na₂HPO₄.
- 2 mM KH₂PO₄.

En este trabajo se emplea tampón comercial en polvo de Amresco (referencia 0780-10L).

-Solución de Lavado para la Tinción de Fosfatasa Alcalina:

- 0,1M Tris HCl pH 9.5.
- 0,1M NaCl.
- 0,01M MgCl.

-Solución de Tinción para Fosfatasa Alcalina:

- 0,1M Tris HCl pH 9.5.
- 0,1M NaCl.
- 0,05M MgCl.
- NBT/BCIP (uso según protocolo; ref.11681451001 Roche) .

Los sustratos NBT/BCIP son soluciones de tetrazolio nitro-azul y 5-bromo-4-cloro-3'-indolil fosfato, que reaccionan frente a la fosfatasa alcalina.

-Solución de Extracción de ADN:

- 0,05 M TRIS pH 8.0
- 0,1 M EDTA.
- 0,1 M NaCl.
- 1% SDS.

-Solución TrisBoratoEDTA 5X (TBE):

- 0,45 M Tris-borato.
- 10mM EDTA.
- Ajustar a pH 8.0 con ácido acético glacial o HCl.

-Fenol / Cloroformo (1:1):

- Solución de fenol (P4557 Sigma).
- Cloroformo ref. 1.02445.1000 Merk.
Seguir las instrucciones del producto.

Verter el tubo pequeño (tampón) que acompaña al fenol de Sigma en el grande, y mezclar suavemente. Esto ayudará a estabilizar el pH. Dejar reposar 2h en la nevera. Mezclar el fenol con el cloroformo a partes iguales y alicuotar en tubos falcon de 50 ml. Antes de utilizarlo, esperar a que se separen las fases. Mantener en refrigeración.

-Tris EDTA (TE) buffer, 1X:

- 10mM TRIS-ClH pH 8.0.
- 1mM EDTA pH 8.0.

-PBS / EDTA:

- 137 mM NaCl.
- 2.7 mM KCl.
- 10 mM Na₂HPO₄.
- 2 mM KH₂PO₄.
- 1 mM EDTA.

-Solución para lisado de células sanguíneas:

- 0,16 M NH₄Cl (ref. 1.01145.0500 Merck).
- 0,17 M Tris pH 7,65.
- HCl (ref. 1.00317.1000 Merck).

-Tampón Tris salino (TBS) 10X, pH 7.6:

- 100 mM Tris base.
- 150 mM NaCl.
- En agua destilada estéril.
-

-Fijador para Tinción LacZ de embriones:

- Formaldehído 1%,
- Glutaraldehído 0,2%.
- 5 mM EGTA.
- 2 mM Cl_2Mg_2 .

En PBS.

-Solución Lavado para Tinción LacZ.

- Cl_2Mg_2 mM.
- 0,01% NaOS.
- 0,02%, NP_4O .
- Suero Fetal Bovino 0,05%.
- En PBS.

-Solución de Tinción LacZ:

- 2 mM. Cl_2Mg_2
- 0,01% NaOx.
- 0,02%, NP_4O .
- Suero Fetal Bovino 0,05%.
- 5 mM K_3Fe .
- 5 mM K_4Fe .
- 1 mg/ml X-Ga.

-Preparación e Inyección de Tamoxifeno:

- Tamoxifeno Sigma T5648.
- Aceite de maíz Sigma C 8267.
- Baño térmico.

Calentar el aceite de maíz a 42°C durante 30 minutos en el baño térmico. Diluir poco a poco el Tamoxifeno a 10mg/ml. a 37°C para que no se formen grumos. Alicuotar y guardar a -20°C. Se administra por vía intraperitoneal.